

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Vojtěch Duchoslav

**Mikrodomény ve sladkovodním sedimentu jako řídicí faktor
biogeochemických procesů**

Microdomains in freshwater sediment as a driving factor
in the biogeochemical processes

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Lukáš Falteisek

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 08. 2016

Vojtěch Duchoslav

Poděkování

Během práce na tomto výzkumu a při sepisování tohoto textu mne nezištně podpořil nespočet lidí. Nemohu je tady zvládnout všechny vyjmenovat.

Přesto si nemohu odpustit poděkovat svému školiteli Lukáši Falteiskovi, který mi věnoval svůj čas, kdykoli jsem si o to řekl. Petru Drahotovi děkuji za zajímavý problém, Lucii Diblíkové za tisk a praktické rady, Kodulce za korektury a Milošovi Duchoslavovi za to, že mě honil do práce a staral se o Arachne.

Obsah

Seznam zkratek	6
Abstrakt.....	7
Klíčová slova	7
Abstract	8
Key words	8
1 Cíle práce	9
2 Úvod	9
2.1 Lokalita	9
2.2 Arsen a síra jako metabolické substráty.....	13
2.2.1 Cyklus síry	13
2.2.2 Cyklus arsenu.....	15
2.3 Problém definice prokaryotických druhů	17
2.4 Proč potřebujeme fylogenetickou disimilaritu?	18
2.5 Zdroje diverzity biogeochemických procesů	21
3 Materiál a metody	23
3.1 Přístroje	23
3.2 Chemikálie	24
3.2.1 Roztoky	24
3.3 Odběr vzorků	24
3.4 Izolace DNA.....	24
3.5 PCR.....	24
3.6 Elektroforéza v agarosovém gelu	26
3.7 Extrakce DNA z agarosového gelu	26
3.8 Sekvenace	26
3.9 Zpracování sekvencí	26
3.10 Bioinformatická analýza	27
3.11 Obsah uhlíku a síry	28
3.12 Inkubace	28
3.13 Krystalizační experimenty <i>in situ</i> – excalibur	28
3.14 Světelná mikroskopie, SEM (+ EDS), HRTEM	30
3.15 Identifikace minerálních fází	30

4	Výsledky	30
4.1	Výskyt realgaru.....	30
4.2	Rychlost biogenního srážení realgaru	32
4.3	Pedologie, rozlišené redox domény	34
4.4	Obsah uhlíku a síry v rozlišených doménách	35
4.5	Inkubace	37
4.6	Sekvenace.....	38
4.7	UniFrac	39
5	Diskuse	46
5.1	Domény	47
5.2	Inkubace	48
5.3	Mechanismus biogeneze realgaru	49
5.4	Kam dál?.....	51
6	Závěr.....	51
7	Literatura.....	52
8	Přílohy	55

Seznam zkratek

OTU – operační taxonomická jednotka

TEA – terminální elektronový akceptor

TOC – celkový organický uhlík (total organic carbon)

UPGMA – metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (unweighted pair group method with arithmetic mean)

MDS – multidimensional scaling, česky metrické škálování

PCoA – principal coordinates analysis , česky analýza hlavních koordinát, synonymum MDS

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

EDX – energy-dispersive X-ray spectroscopy – semikvantitativní analytická metoda, která bývá součástí elektronových mikroskopů

SAED – selected area electron diffraction – analytická metoda pro krystalické látky, která bývá součástí transmisních elektronových mikroskopů

As⁵⁺ – Indexem je označen oxidační stav atomu a tento zápis zahrnuje všechny formy pětimocného arsenu, ať už vázaného v minerálech, či rozpuštěného v roztoku jako arseničnan v různém stupni disociace. Nejde o samostatný iont, který v tomto případě ani neexistuje. Obdobně jsou značeny oxidační stavy dalších prvků.

Abstrakt

Na přirozené arsenové anomálii v Mokrsku dochází k bioprecipitaci realgaru (As_4S_4) v potočném sedimentu. Rozsah tohoto jevu je světově ojedinělý. Předcházející práce prokázala schopnost mikroorganismů uvolňovat arsen z pevných fází do roztoku a také jejich schopnost respirativní redukcí produkovat sulfidickou síru a i trojmocný arsen, tedy prekursor realgaru. Zároveň ale vyvstaly zásadní otázky ohledně mechanismu srážení realgaru, neboť se nikdy nepodařilo naměřit chemicko-fyzikální podmínky, které by jeho krystalizaci umožňovaly.

Pro pochopení funkce systému byly chemicky a mikrobiologicky analyzovány půdní profily do hloubky cca 120 cm. Tento rozsah zahrnuje oblast kolísání hladiny spodní vody. Podařilo se nám rozeznat šest odlišných domén, které reprezentují prostředí od povrchové půdy po anoxický sediment obsahující dřevo inkrustované realgarem. Srovnání fylogenetické disimilarity ukázalo, že komunity domén tvoří navzájem převážně distinktní klastry, což svědčí o rozdílných podmínkách a procesech, které zde probíhají.

Inkubační (mikrokosmové) experimenty ukázaly, že bioprecipitace realgaru *in vitro* je možná a vyžaduje omezení mikrobiální aktivity v roztoku a jeho striktní lokalizaci do dřevní hmoty či na její povrch. Pokud je nám známo, je tato práce vůbec prvním případem úspěšného biogenního srážení realgaru v laboratorních podmínkách.

Získané poznatky tvoří řetězec nepřímých důkazů, že srážení realgaru není podmíněno přítomností specifických mikroorganismů, nýbrž kombinací kontrastujících mikrohabitatů. Významná je přítomnost dřevních zbytků pohřbených na začátku 80. let 20. století. Ty tvoří domény s nadbytkem organického uhlíku v jinak velmi oligotrofním okolí, které obsahuje sírany. Na povrchu dřevní hmoty dochází vlivem respirativní redukce síranů a arseničnanů k lokálnímu přesycení roztoku vůči realgaru. Díky dlouhotrvajícím glejovým procesům je tato doména ochuzena o ionty železa, které by vyvolávaly reakce konkurující srážení realgaru. Přesná charakterizace podmínek v těchto doménách je otázkou pro další výzkum vyžadující pokročilou instrumentaci pro měření vlastností pórového roztoku ve velmi malých objemech *in situ*.

Klíčová slova

arsen, biomineralizace, lokální gradienty, mikrohabitaty, realgar

Abstract

A natural arsenic anomaly at Mokrsko is a site of biogenic precipitation of realgar (As_4S_4) in stream sediment. The extent of the phenomenon in Mokrsko is globally unique. A previous study showed the ability of microorganisms to solubilize arsenic from its secondary minerals and to produce realgar precursors, i.e. sulfides and arsenites, by anaerobic respiration. The study also raised questions about the mechanism of realgar precipitation since physicochemical conditions favoring this reaction were never detected despite significant sampling efforts.

We chemically and microbiologically analyzed sedimentary profiles to the depth of ca. 120 cm in order to understand the functioning of the biogeochemical system. The profiles comprised both the unsaturated and the saturated zone. We distinguished six different domains representing environments from the surface soil to anoxic sediment containing realgar-encrusted wood. An analysis of phylogenetic dissimilarity revealed that microbial communities from the various domains form distinct clusters. This suggests that different conditions prevail in the various domains, and that different biogeochemical processes take place there.

Incubation (microcosm) experiments showed that bioprecipitation of realgar can be conducted *in vitro*. It requires a suppression of the microbial activity in the solution and a strict localization of the biogenic processes to the wood material. To our best knowledge, this is the first successful bioprecipitation of realgar in laboratory conditions.

Our results form a chain of indirect proofs, showing that realgar precipitation does not depend on the presence of specific microorganisms, but instead requires a combination of contrasting microhabitats. The presence of decomposing wood that was buried here during the early 1980s is of special importance. The wood remnants form organic carbon-rich domains in the extremely oligotrophic and sulfate-containing bulk sediment. The solution is locally oversaturated towards realgar due to an intensive sulfate and arsenate respiration on the wood surface. The anoxic domain is depleted in iron content thanks to the long-lasting gley process. This is important since ferrous ions can outcompete arsenic during sulfide precipitation. An exact characterization of the conditions in the sediment domains will require further research using advanced instruments for *in situ* measuring of the parameters of pore solution in extremely small volumes.

Key words

arsenic, biomineralization, local gradients, microhabitats, realgar

1 Cíle práce

1. Popsat mikrobiální diverzitu v prostředí, kde se sráží realgar.
2. Odhadnout rychlost vzniku realgarových agregátů.
3. Dosáhnout precipitace realgaru *in vitro*.
4. Navrhnout model fungování přirozeného systému srážejícího realgar.
5. Pokusit se odvodit, proč je bioprecipitace realgaru jev tak unikátní.

2 Úvod

Přírodní kontaminace podzemních vod arsenem jsou rozšířeným celosvětovým problémem, který má zásadní vliv na lidské zdraví (Nordstrom 2002). Zároveň toho současná věda neví mnoho o biogeochemických procesech, které vedou k uvolňování arsenu z pevných fází, nebo naopak k jeho precipitaci a odstranění z roztoku. Proto probíhá intenzivní výzkum v různých oblastech arsenových kontaminací.

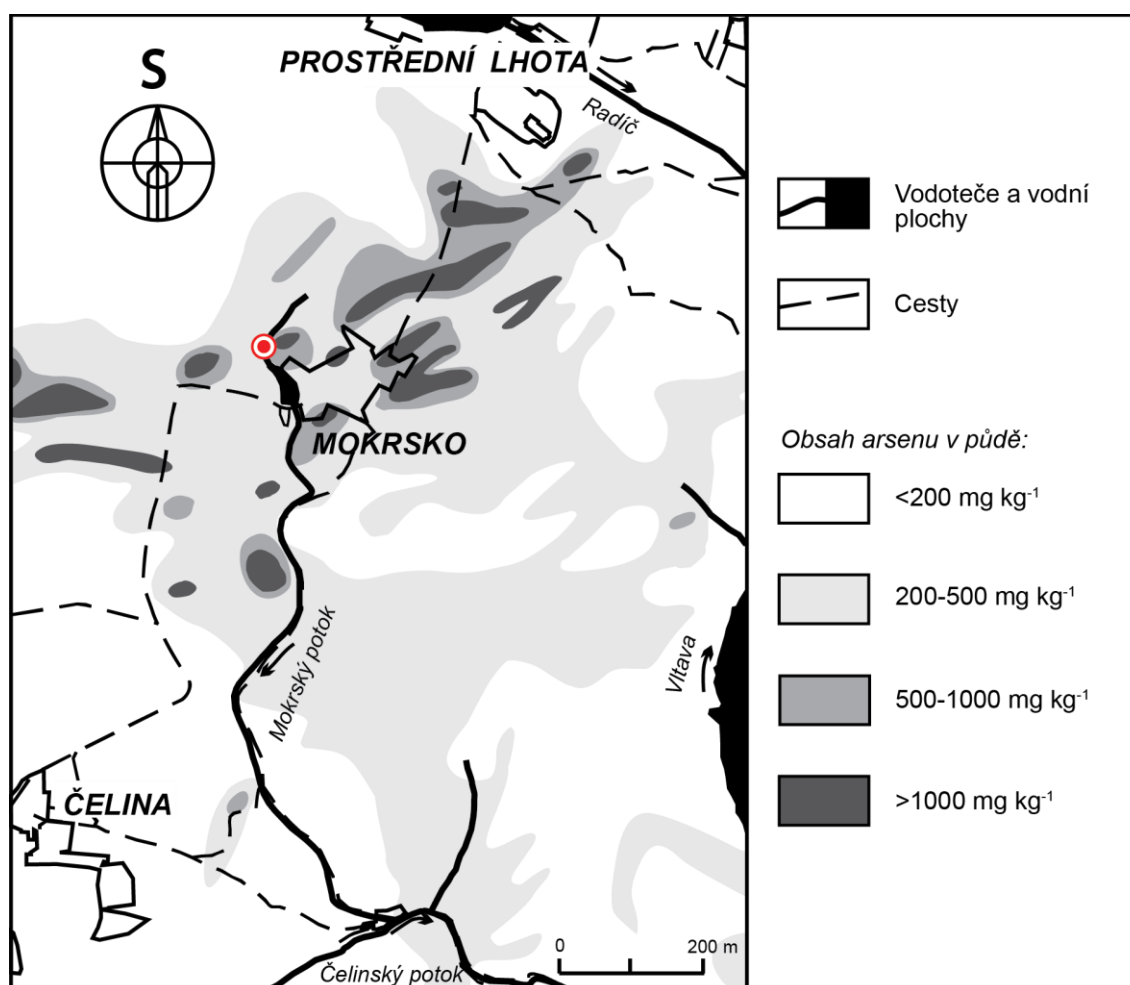
Jednou z intenzivně zkoumaných lokalit je přirozená arsenová anomálie v okolí obce Mokrsko, kde byly vůbec poprvé nalezeny nově vzniklé makroskopické agregace realgaru (As_4S_4) v prostředí s nízkými teplotami mimo hydrotermální vlivy (Redlich 2011; Drahota, Falteisek, et al. 2013). Na světě byly popsány jen dvě další lokality, kde podobné procesy probíhají. Jednou z nich je sediment z vrtu v bývalé továrně na pesticidy poblíž Sanfranciského zálivu v Kalifornii v USA (O'Day et al. 2004), druhou je rašeliniště Gola di Lago ve Švýcarsku, které je přirozeně nabohacené arsenem (Langner et al. 2013).

Bioprecipitace sulfidů arsenu je raritní jev, přitom arsen je v prostředí poměrně běžný a Mokrská lokalita není na první pohled zvláštní jeho zdrojem, koncentrací, ani jiným nápadným jevem (až na realgar). Dá se tedy předpokládat, že o srážení realgaru rozhoduje kombinace skrytých jevů, které unikají naší pozornosti. Jejich pochopení by bylo využitelné nejen pro podporu přirozené atenuace arsenu jako metody čištění podzemních vod, ale především by mohlo vést k lepšímu poznání zákonitostí biomineralizace sulfidů obecně.

2.1 Lokalita

Zkoumaná lokalita je součástí přírodní arsenové anomálie poblíž obce Mokrsko v příbramském okrese (49°44'43"N, 14°20'01"E). Nachází se zde ložisko zlata Mokrsko-západ – přibližně 100 t Au (Morávek et al. 1989; Zachariáš et al. 2014), které nikdy nebylo těžené a jeho oxidační zóna je tedy v přirozeném stavu. Zvětráváním zlatonosného arsenopyritu dochází v této oblasti k nabohacení půd a vod arsenem (Janatka and Morávek 1990; Drahota et al. 2006, 2009) a díky historickým i novodobým průzkumům zlatonosného ložiska je oblast dobře zmapována (Obrázek 1). V půdách je As vázán především na sekundární arseniosiderit,

farmakosiderit, nebo adsorbován na Fe (hydr)oxidy (Drahota et al. 2009). Mikrobiální redukce těchto fází je pak hlavním řídicím faktorem uvolňování arsenu do roztoku (Drahota, Falteisek, et al. 2013). Koncentrace arsenu v podzemní vodě zde dosahuje hodnot 7,33–8,08 mg/l a v povrchové vodě 0,38–0,55 mg/l (Drahota, Falteisek, et al. 2013; Drahota, Nováková, et al. 2013). Vysoké koncentrace As byly rovněž naměřeny v soukromých studnách v Mokrsku (0,26 – 8,08 mg/l), které byly až do zavedení vodovodu v roce 1989 používány jako zdroj pitné vody (Jílek 1985; Janatka and Morávek 1990). Přitom platný hygienický limit je pouze 10 µg/l (Vyhláška č. 252/2004 Sb.).



Obrázek 1: Koncentrace arsenu v půdě v okolí Mokrska. Upraveno podle (Janatka and Morávek 1990). Analyzována byla frakce <0,063 mm horizontu B. Červeně je vyznačena naše výzkumná lokalita.

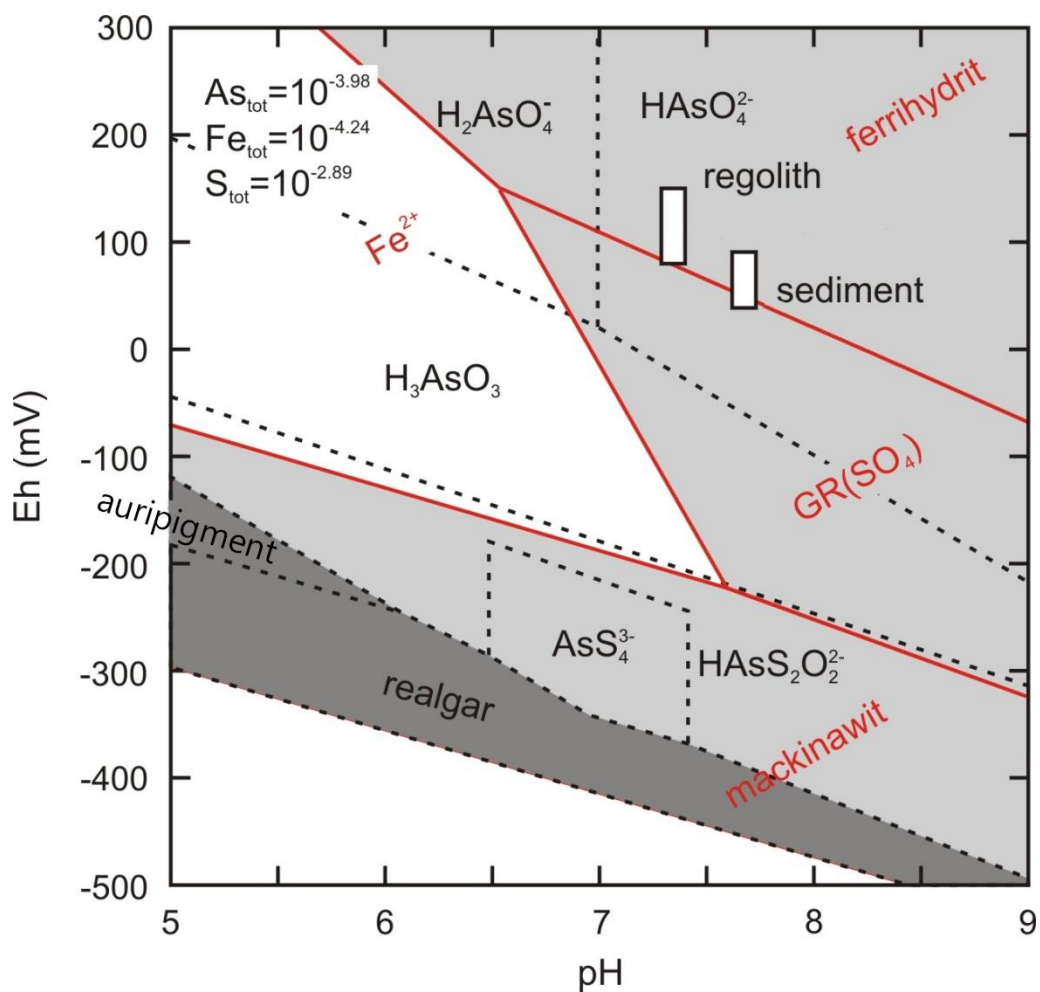
Drahota a jeho diplomant Redlich zde v roce 2011 objevili ložisko realgaru (Redlich 2011), který se sráží na dřevní hmotě pod hladinou spodní vody v redukovaném sedimentu vodoteče (Drahota, Falteisek, et al. 2013). Jedná se o strouhu, která odvodňuje pole a louku a napájí rybník. Současná podoba je výsledkem odvodňovacího zásahu z roku 1980 (Kulhavý 2014). V rámci této meliorace byly do okolních polí položeny drény a svedeny do prohloubeného

koryta vodoteče. Vrchní část vodoteče je zatrubněna a posléze pokračuje korytem zpevněným betonovými tvarovkami, které jsou dnes pohřbeny v sedimentu (Obrázek 2).

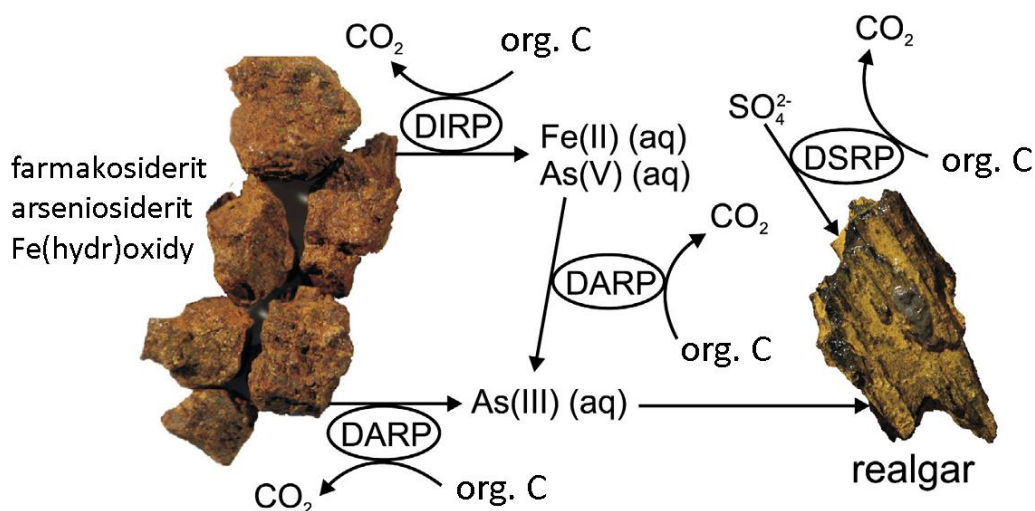


Obrázek 2: Lokalita s výskytem realgaru. Jedná se o odvodňovací strouhu vyhloubenou roku 1980 a zpevněnou betonovými tvarovkami, které jsou dnes zcela pohřbeny v sedimentu.

V práci (Drahota, Falteisek, et al. 2013) autoři analyzovali dva poměrně hrubě sebrané vzorky z této lokality – regolith a fluviální sediment, které zhruba odpovídají oxidované zóně bez realgaru a redukované zóně s realgarem. Při analýze půdní vody, vytažené z těchto prostředí lyzimetry, vyšlo najevo, že chemické složení těchto roztoků je daleko od podmínek, kde je realgar termodynamicky stabilní (Obrázek 3). To by se dalo vysvětlit například tím, že chemicko-fyzikální podmínky, ve kterých se může realgar srážet panují jen ve velmi lokalizovaně malých objemech, které se nedají standardním lyzimetrem odebrat. Později jsme provedli obdobný pokus o odebrání vody pomocí mikrolyzimetrů, ale se stejným výsledkem. Autoři sice navrhli konceptuální model speciace arsenu na Mokrsku (Obrázek 4), ten ale nabízí vysvětlení jen původu redukovaných prekurzorů realgaru a neříká nic o způsobu jeho srážení.



Obrázek 3: Eh-pH diagram (Drahota, Falteisek, et al. 2013). Diagram ukazuje rovnováhu mezi roztoky (bez zatmavení, přerušovaná čára) a pevnými fázemi (tmavší šedá) arsenu a roztoky (bez zatmavení, plná červená čára) a pevnými fázemi (světlejší šedá) železa při koncentracích $\text{As}_{\text{tot}} = 10^{-3.98}$, $\text{Fe}_{\text{tot}} = 10^{-4.24}$, $\text{S}_{\text{tot}} = 10^{-2.89}$. Rozsah hodnot Eh a pH, naměřených ve vzorcích vody pocházející z lyzimetrů na lokalitě Mokrsko, je reprezentován obdélníky.



Obrázek 4: Konceptuální model speciace arsenu v půdách na Mokrsku (Drahota, Falteisek, et al. 2013). Model shrnuje základní mikrobiálně zprostředkované reakce, které ovlivňují koncentrace a speciaci arsenu. DARP: prokaryota redukující arseničnany (dissimilatory arsenate respiring prokaryotes), DIRP: prokaryota redukující železo (dissimilatory iron respiring prokaryotes), DSRP: prokaryota redukující sírany (dissimilatory sulphate respiring prokaryotes).

2.2 Arsen a síra jako metabolické substráty

2.2.1 Cyklus síry

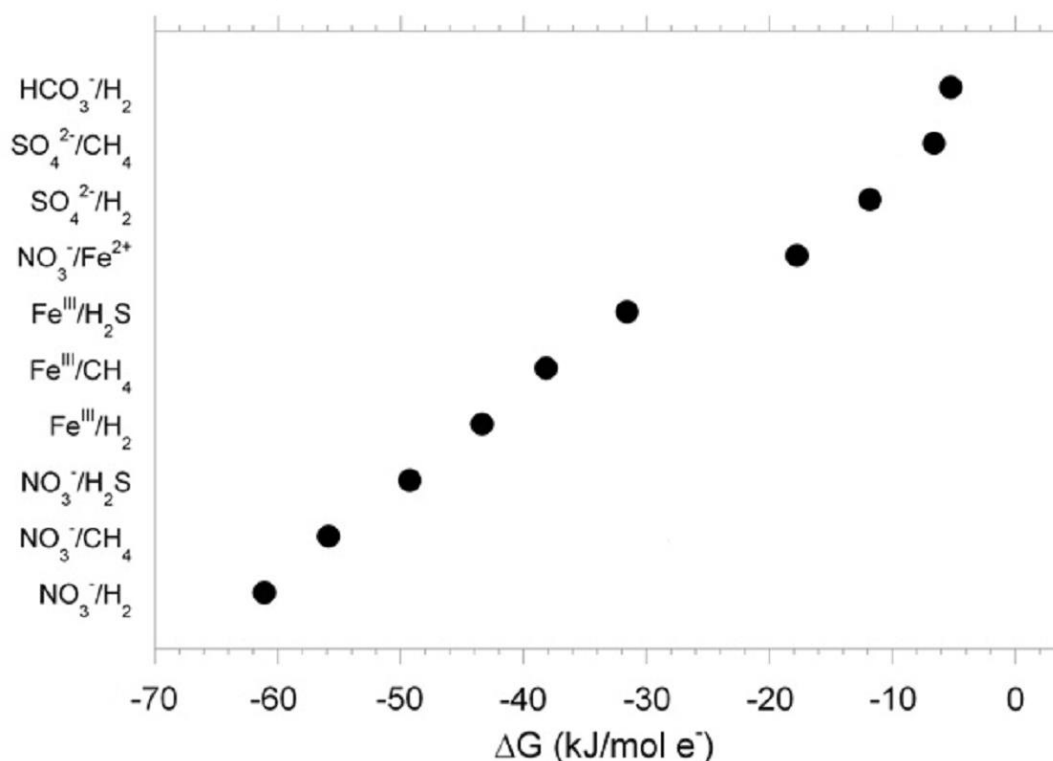
Je dobře známo, že na redoxním cyklu síry se v litosféře podílí převážně respirativní redukce elementární síry a síranů a na druhé straně chemolitotrofní oxidace sulfidů (Ivanov and Karavaiko 2004). Možná je i anoxigenní fotosyntéza využívající sulfidickou síru jako zdroj elektronů pro asimilaci CO₂ (Hanada 2016).

Oxidace sulfidů kyslíkem může probíhat i zcela anorganicky. Nicméně je tato reakce natolik významným zdrojem energie, že si ji organismy nemohou nechat ujít. Proto ji často podporují prostřednictvím oxidace Fe²⁺. Vznikající Fe³⁺ pak anorganicky oxiduje sulfid a sám se recykluje na Fe²⁺ (Colmer and Hinkle 1947). Například v rudných dolech, kde jsou sulfidické minerály vystaveny vzdušnému kyslíku, žijí běžně na tomto energetickém zdroji celá složitá mikrobiální společenstva (Johnson 1998; Falteisek et al. 2016).

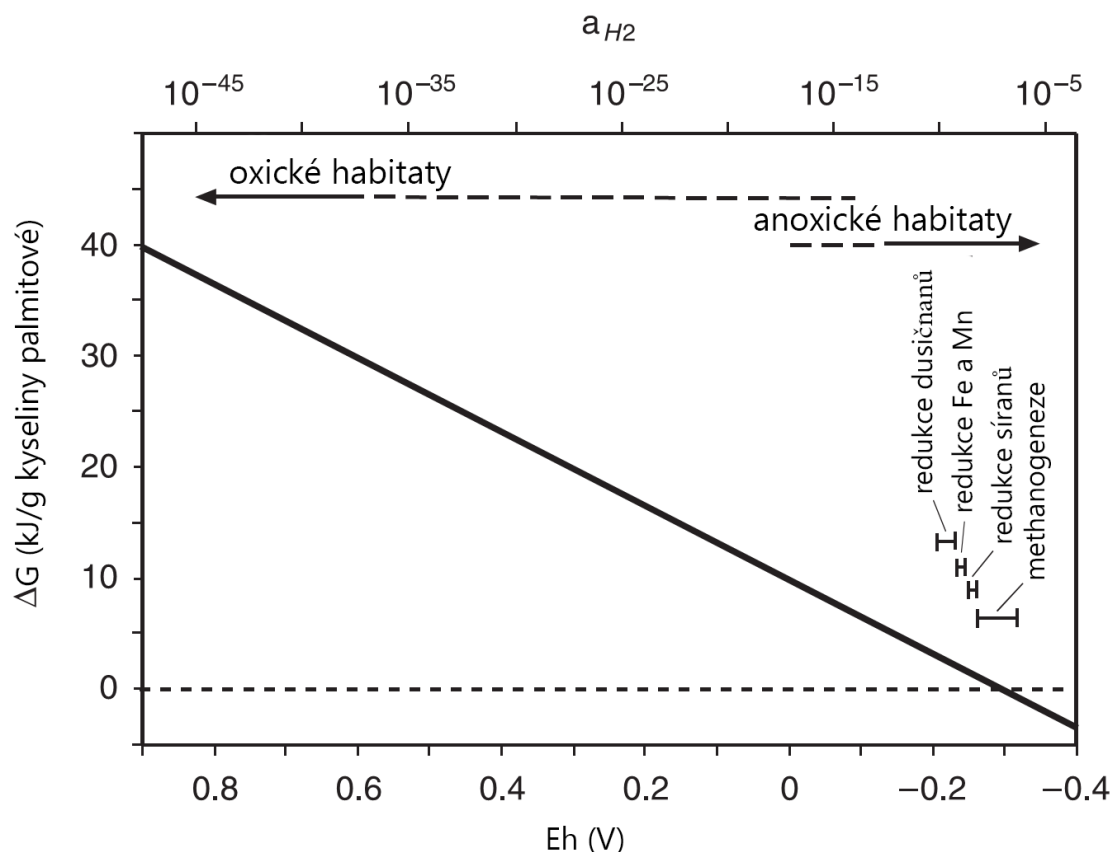
Redukční část cyklu síry obstarávají mikroorganismy při utilizaci organického materiálu v silně redukčních podmínkách. Sírany nejsou příliš ochotné elektronové akceptory. Proto k jejich redukci obvykle dochází až po relativním vyčerpání vhodnějších oxidačních činidel, jako jsou O₂, NO₃⁻, Fe³⁺, Mn⁴⁺, As⁵⁺ apod. (Boettger et al. 2013). Nuznějším řešením už je jen metanogeneze, tedy využití CO₂ jako terminálního elektronového akceptoru (TEA). Viz Obrázek 5. V silně redukčních podmínkách jsou sice mikroorganismy nuceny využívat horší elektronové akceptory s menším energetickým výtěžkem, na druhou stranu je zde z energetického hlediska

levnější fixace uhlíku a stavba organických molekul (Obrázek 6). Proto se v takovém prostředí smazává rozdíl mezi autotrofy a heterotrofy, co do energetických vkladů do buněčného růstu (McCollom and Amend 2005).

Geochemická aktivita reducentů síry a síranů je celkem vzato enormní. Stačí si třeba vzpomenout na typický pach sirovodíku, unikajícího z bahna, když se jdete v létě koupat do rybníka. To běžně vede k nabohacení sedimentů v akvatických ekosystémech sekundárními sulfidickými minerály (např. FeS_2 , FeS , CuS , Cu_2S , ZnS) (Ivanov and Karavaiko 2004).



Obrázek 5: Relativní energetický výtěžek přenosu elektronu v různých metabolických reakcích (Boettger et al. 2013, upraveno). Přestože jsou hodnoty energetického výtěžku vypočítány pro aktivity reaktantů v oceánském dně na konkrétní výzkumné lokalitě zdrojové publikace, je minimálně trend v pořadí elektronových akceptorů zobecnitelný pro většinu anoxických sedimentů.



Obrázek 6: Energetické náklady na syntézu kyseliny palmitové jako funkce redoxního potenciálu (McCollom and Amend 2005, upraveno). Graf se vztahuje k reakci $16 \text{ HCO}_3^- + 107 \text{ H}^+ + 92 \text{ e}^- \rightarrow \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COO}^- + 46 \text{ H}_2\text{O}$. Redukční potenciál je na spodní ose vyjádřen standardně ve voltech a na horní ose v ekvivalentní aktivitě rozpuštěného H_2 . Obrázek ilustruje trend snížených nákladů na fixaci CO_2 a stavbu organických molekul v redukčním prostředí. Rovněž jsou zde pro srovnání zobrazeny typické rozsahy aktivit H_2 v prostředích obývaných anaeroby. Ti jsou rozděleni podle TEA.

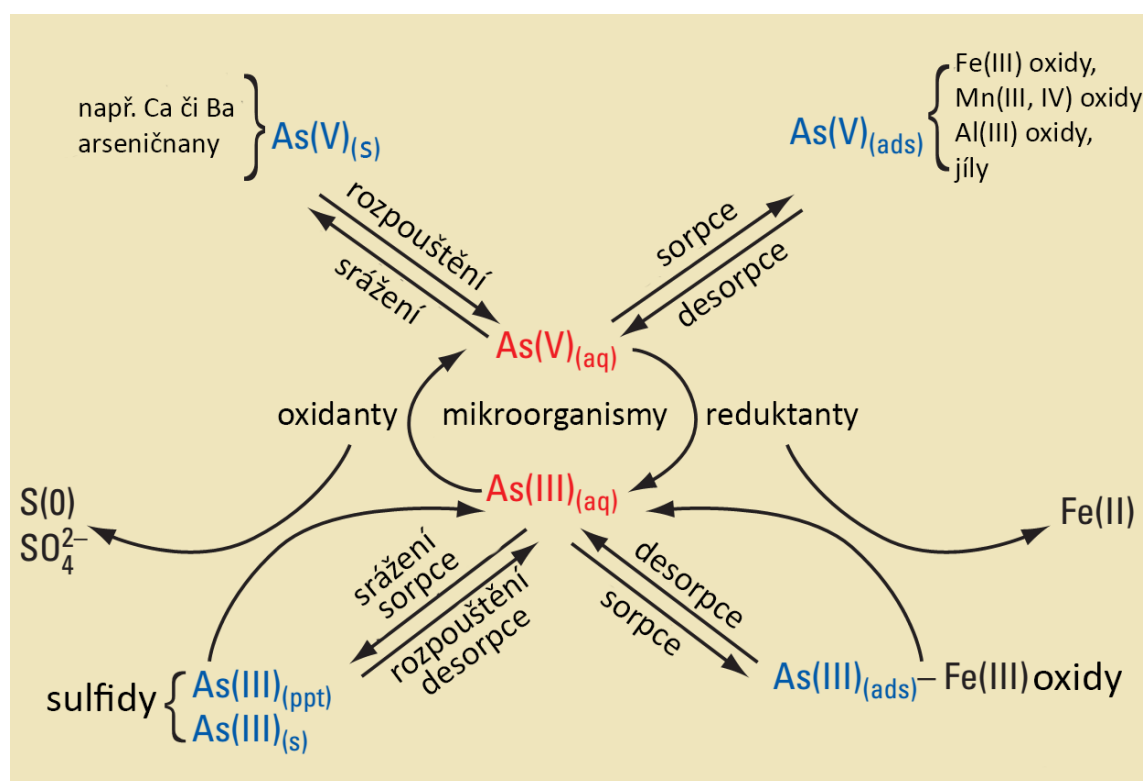
2.2.2 Cyklus arsenu

Arsen se do vodního ekosystému uvolňuje obvykle oxidativním rozpouštěním primárních sulfidických minerálů, nebo naopak reduktivním rozpouštěním sekundárních železitých (hydr)oxidů, které mají vzhledem k arsenu velkou adsorpční kapacitu (Hudson-Edwards and Santini 2013). Oba procesy jsou přitom řízeny převážně mikrobiální činností (Sharma and Sohn 2009; Fazi et al. 2016).

V oxidačním prostředí je tedy As uvolňován z primárních sulfidů, aby se adsorboval na sekundární (hydr)oxidy železa. Všechno ale může běžet i naopak a v redukčních podmínkách mohou být železité (hydr)oxidy a jiné oxidované sekundární fáze respirativně rozpouštěny za současné degradace organické hmoty, čímž se As uvolňuje do roztoku a může být rovněž respirován z As^{5+} na As^{3+} (Rochette et al. 1998; David E. Cummings et al. 1999; Nickson et al. 2000). V redukčním prostředí, kde dochází k precipitaci sekundárních sulfidů (viz předchozí

kapitolu), mohou při dostatečných koncentracích arsenu vznikat i sulfidy arsenu – auripigment či realgar. Preferenčně ale vznikají sulfidy např. železa a arsen se na ně pouze adsorbuje. Speciaci arsenu a jeho základní biogeochemické reakce ilustruje Obrázek 7.

V roztoku může arsen přecházet mezi dvěma redoxními stavy, As^{3+} a As^{5+} . Všeobecně se má za to, že redukovaná forma je toxičtější a ve vodném prostředí mobilnější. I pro bakterie a archea je arsen primárně toxický. Ty však zároveň mohou pracovat s redoxním párem arsenitan/arseničnan a využívat sloučeniny As pro energetický metabolismus jako TEA v anaerobní respiraci, nebo jako donor elektronů pro chemolitotrofii.



Obrázek 7: Schematické znázornění speciace arsenu (Reisinger et al. 2005, upraveno). Arsen může být mikrobiálními procesy převáděn mezi formami vázanými v krystalové mřížce minerálů (s), adsorbovanými na jejich povrchu (ads) a rozpuštěnými v roztoku (aq) stejně, jako může být převáděn mezi formami oxidovanými (nahore) a redukovanými (dole).

2.3 Problém definice prokaryotických druhů

Před rozšířením genomických metod byla koncepce prokaryotického druhu založena na polyfázickém přístupu. Tedy na kombinaci parametrů, jejichž výčet byl omezen především dostupností analytických metod. Druhy byly definovány například na základě metabolických parametrů, složení membránových lipidů, obsahu GC párů v DNA, míry hybridizace genomové DNA s již popsányými druhy apod. Se zpřístupněním nových metod stačilo vždy jen přidat další parametr, například shodu v sekvenci 16S rDNA, či jiných genů se známými druhy (Rosselló-Móra 2012). Druh byl chápán jako skupina jedinců či kmenů vykazujících ve zkoumaných parametrech alespoň určitou minimální míru podobnosti. Proto v konceptu polyfázické taxonomie má smysl definovat a hledat hodnotu např. minimální míry hybridizace DNA nebo podobnosti sekvence 16S rDNA dostačující pro zařazení dvou izolátů do jednoho druhu, rodu, čeledi atd.

Nicméně takto definovaný druh v mnoha případech zahrnuje několik ekologicky i geneticky distinktních linií, a nemůže tedy sloužit jako základní jednotka biologické diverzity a neodpovídá biologické realitě. Zcela praktickou nevýhodou pak je, že pro stanovení většiny parametrů, potřebných k polyfázickému taxonomickému zařazení, je nutná kultivace. I přes signifikantní rozvoj kultivačních metod je tak velká část mikrobiální diverzity pro polyfázickou taxonomii nepostižitelná.

Ani sekvenování a porovnávání celých genomů tento problém zcela neřeší, neboť u bakterií, archeí a do značné míry i u eukaryot je běžný horizontální přenos částí genetické informace i mezi zcela nepříbuznými liniemi. Proto se objevily snahy nahradit koncept druhu jakýmsi genetickým kontinuem. Ale genomické studie ukázaly, že genový tok není ani u bakterií a archeí prost zákonitostí a rovněž není zcela determinován tlakem prostředí na šíření konkrétních funkčních genů. Zdá se tedy, že koncept druhu má u prokaryot stále v nějaké svojí podobě smysl.

Není takový problém v konkrétním případě operativně definovat populaci. Ta je skupinou organismů, které společně obývají stejné prostředí a vykazují populačně specifický tok genů. To je podobné konceptu ekotypů, až na to, že jednotlivé populace jsou od sebe separovány bariérami v toku genů, kdežto ekotypy jsou soubory jedinců selekcí směřovaných k obsazení podobné niky (Cordero and Polz 2014).

Pro definici druhu jakožto geneticky soudržné skupiny (Cordero and Polz 2014) navrhuji rozlišit jádrový genom, obsahující geny nezbytné pro život a přítomné u všech populací, geny nesoucí adaptaci na určitý typ prostředí a přítomné ve vysoké frekvenci v některých populacích, a nakonec geny přítomné ve střední až nízké frekvenci ve všech populacích a podléhající frekvenčně závislé selekci. Tento koncept tedy spočívá v interpretaci

prokaryotického druhu jako souboru populací, které jsou schopny spolu sdílet všechny geny i polygenní znaky, které se nedají jednoduše přenést např. v jednom operonu. Definice ještě není dokonalá, ale v současné době skýtá nejlepší přiblížení k biologické realitě.

Každopádně je jisté, že použijeme-li k identifikaci organismů pouze jeden gen, nemůžeme dosáhnout věrného rozlišení druhů. Většina studií, založených na sekvenaci 16S rDNA, sdružuje tyto sekvence do operačních taxonomických jednotek (OTU), které jsou definované vzájemnou shodou sekvencí z min. 97 %. Dá se očekávat, že takto definované OTU v sobě zahrnují několik vzájemně podobných biologických druhů (Rosselló-Móra 2012). Nicméně v případě, že se podařilo jednoznačně přiřadit OTU k sekvenci z popsaného druhu, můžeme předpokládat, že se s ním bude shodovat alespoň v základních vlastnostech. Je třeba mít na paměti tento poměrně vágní vztah OTU s reálnými druhy i při dalším čtení tohoto textu, neboť jej nebudeme vždy zdůrazňovat. Vedlo by to ke zbytečné šroubovanosti formulací.

2.4 Proč potřebujeme fylogenetickou disimilaritu?

Běžný postup srovnávání společenstev makroorganismů spočívá v mnohorozměrné analýze dat o počtech zástupců různých druhů na jednotlivých stanovištích. Tento přístup předpokládá unimodální odpověď početnosti druhu na parametry prostředí. To se dá v případě mikrobiálních společenstev předpokládat také. Narážíme zde ale na problém, že OTU nejsou druhy a počty sekvencí nejsou jejich abundance.

Počet sekvencí, který zde používáme jako ekvivalent abundancí, je zkreslen jednotlivými kroky PCR, selektivitou primerů, přítomností dormantních stádií apod. To je potřeba mít na paměti při interpretaci výsledků, případně lze abundance nejdůležitějších OTU zpřesnit pomocí kvantitativní PCR. Pro zjištění poměru aktivních a dormantních stádií se dá použít srovnání DNA a RNA. Překryv OTU mezi vzorky bývá typicky velmi nízký a je nasnadě, že porovnáváním vzorků, z nichž každý má mnoho unikátních OTU, které se v jiných vzorcích nevyskytují, mnoho informací nezískáme. Proto je potřeba do analýzy vnést ještě informaci o vzájemné příbuznosti jednotlivých OTU. To naštěstí, vzhledem k tomu, že je každá OTU reprezentována konsenzuální sekvencí, není velký problém. Samozřejmě je třeba mít stále na paměti omezení vyplývající ze sekvenace jediného genu, které je popsáno v předešlé kapitole.

Dnes je již poměrně rutinní řešení problému nízkého překryvu OTU mezi vzorky náhrada disimilarity založené na sdílených taxonech takzvanou fylogenetickou disimilaritou. Ta je pro dvojici společenstev definována jako poměr délky větví fylogenetického stromu, které vedou k OTU zastoupeným pouze v jednom společenstvu, k délce větví obsahujících zástupce z obou společenstev (Obrázek 8). To umožňuje srovnání společenstev, která nesdílí ani jednu OTU (Lozupone and Knight 2005). Autoři nazvali tuto metodu UniFrac, neboť měří frakci větví fylogenetického stromu, která je unikátní pro srovnávané vzorky (unique fraction). Výsledkem

takové analýzy je symetrická distanční matice, kterou lze vizualizovat například UPGMA klastrováním nebo mnohorozměrnou analýzou (PCoA či MDS).

Koncept fylogenetické disimilarity má několik zásadních výhod. Mezi největší patří bez pochyby schopnost adaptovat rozlišovací práh na takovou úroveň fylogenetické diversity, která je pro tu kterou dvojici porovnávaných společenstev relevantní. Ještě k tomu tento práh nemusí být pro celý strom stejný a stanovuje se pro každou větev zvlášť. To znamená, že nám při použití fylogenetické disimilarity odpadají dilemata ohledně správné definice druhu, nebo nastavení přesného prahu podobnosti pro sjednocování sekvencí do OTU. Rovněž nás už nemusí trápit vznik falešných OTU kvůli chybovosti sekvenace, nebo při společné analýze datasetů z různých sekvenačních metod. Falešná OTU s největší pravděpodobností skončí na jedné větvi s OTU, od níž je odvozena. Teoreticky bychom mohli klastrování sekvencí do OTU zcela přeskočit (pokud bychom nahradili jeho roli při odstraňování chimerických sekvencí) a použít pro UniFrac neklastrované vstupní sekvence, jen by to bylo zbytečně náročné na vypočetní výkon.

Další výhodou je, že k odhalení důležitých trendů stačí překvapivě malá prosekvenovanost vzorků. (Caporaso et al. 2012) ukázali, že pro vysoce signifikantní rozdělení vzorků podle základního typu prostředí (voda, půda, stolice, apod.) stačí deset sekvencí na vzorek.



Obrázek 8: Výpočet fylogenetické disimilarity UniFrac (Lozupone and Knight 2005). Čtverečky, kolečka a trojúhelníčky představují sekvence z různých komunit. Černé větve stromu jsou unikátní pro jednu komunitu, společné větve jsou šedivé. (A) Ukázka společného stromu dvou velmi podobných komunit, kde je naprostá většina větví sdílená. (B) Ukázka stromu dvou komunit, které se od sebe liší maximálně a nesdílejí spolu ani jednu větev. (C) Využití UniFracu pro rozhodnutí, zda jsou dvě komunity signifikantně odlišné. Příslušnost jednotlivých sekvencí ke srovnávaným komunitám je randomizována v n opakováních (r) a pro každé opakování je vypočítán poměr celkové délky unikátních větví. Vypočítaná p hodnota je pak podíl randomizovaných stromů, které mají stejnou nebo větší frakci unikátních větví, než reálný strom. (D) Fylogenetická disimilita může být vypočítána pro všechny párové kombinace komunit v jednom společném stromu. Výsledkem je symetrická distanční matice, která může být dále využita standardními metodami mnohorozměrné analýzy, jako je např. UPGMA či MDS (PCoA).

2.5 Zdroje diverzity biogeochemických procesů

Přes rostoucí počet studií stále ještě nejsou nalezeny jednoznačné příčiny fenoménu mikrobiální hyperdiverzity. Obrovská alfa diverzita organismů v sebeminiaturnějším vzorku půdy, sedimentu, či střevního obsahu je těžko vysvětlitelná počtem trofických úrovní. Pokud je počet organismů výrazně vyšší, než počet trofických úrovní, mělo by docházet ke kompetitivnímu vyloučení druhů sdílejících stejné zdroje. V každém gramu půdy, nebo jiného podobně komplexního prostředí lze najít několik tisíců převážně vzácných OTU (Caporaso et al. 2011; Nemergut et al. 2013).

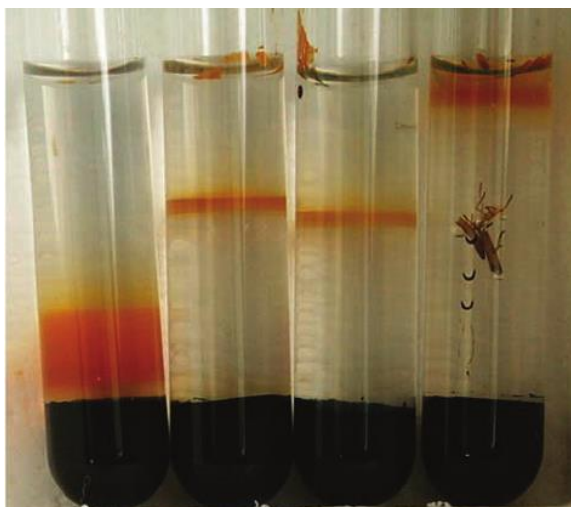
Jedno z možných vysvětlení tkví v nehomogenitě zkoumaných substrátů. Ty mohou obsahovat mnoho skrytých fyzikálně chemických gradientů, které sice nejsme schopni běžnými vzorkovacími metodami rozlišit, nicméně v kontextu velikosti mikrobiální buňky jsou relevantní (Sexstone et al. 1985). Je tedy docela možné, že každý sebepečlivěji odebraný vzorek je vždy směsicí mnoha mikrokomunit. Vždyť i v rámci jednoho biofilmu se podmínky, které selektují zastoupení konkrétních organismů, mohou kruciólně lišit na bázi a na povrchu. Dá se tedy očekávat, že v půdě, složené z různorodého a různě zrnitého organického i anorganického materiálu, mají mikroorganismy k dispozici mozaiku nespojitých habitatů, z nichž navíc každý vykazuje svoji specifickou osidlovací historii, a tedy i specifické biologické interakce (Fraser et al. 2009; Fukami 2010).

Pokud platí předpoklad skryté nehomogenity, pak běžným vzorkováním nezkoumáme alfa diverzitu, nýbrž gama diverzitu směsi mnoha mikrokomunit.

Důležité také je, že mikroorganismy svým metabolismem nehomogenity a gradienty v substrátu zostřují a tím svoje životní prostředí ještě více fragmentují. To se dá odvodit i z čistě myšlenkového konstruktu: Všechny organismy získávají energii pro život z přenosu elektronů z donoru na akceptor. Poměr elektronových akceptorů a donorů zhruba popisuje redukční potenciál. V redukčním prostředí je přebytek donorů a nedostatek akceptorů, kdežto na druhém konci redoxního gradientu, tedy v oxidačním prostředí, je tomu naopak. Spustíme-li na takovém gradientu metabolismus, který urychluje, nebo dokonce umožňuje jinak vůbec neprobíhající přenos elektronů, je jasné, že na jednom konci brzy dojdou akceptory a na druhém donory a gradient se bude postupně zužovat a zvyšovat svoji strmost. Výsledná ostrost rozhraní či strmost gradientu pak bude ustanovena na základě kombinace výkonu metabolismu a rychlosti difuze.

Učebnicový příklad zaostřování redoxního gradientu skýtají bakterie rodu *Gallionella*, které autolitotrofně oxidují železnaté ionty. Jedná se o běžný půdní proces. Výsledkem jejich metabolismu je rezavá sraženina železitých (hydr)oxidů, která je dobře vidět (Obrázek 9).

Podobné zóny bývají vidět i v přírodě kolem kořenů rostlin prorůstajících do anoxického substrátu.



Obrázek 9: Zaostřování redoxního gradientu bakteriemi rodu *Gallionella* (Wang et al. 2009). Ve sloupci média stabilizovaného řídkým agarosovým gelem difunduje ze spodu Fe^{2+} (zdroj – FeS) a shora atmosférický kyslík, který jej oxiduje a sráží ve formě rezavě zbarvené sraženiny. Vlevo je sterilní kontrola, zbývající tři zkumavky jsou inokulovány různými přírodními půdními společenstvy.



Obrázek 10: Fragmentace prostředí do mikrohabitatů s radikálně odlišnými fyzikálně chemickými parametry. Na fotografii je povrch habrové větve, která rok vězela zatlučená na Mokrsku v potočním sedimentu. Značnou srmnost redoxního gradientu na tomto místě dokládá těsné sousedství nově vzniklé realgarové agregace a živé larvy brouka. Realgar je stabilní pouze v silně redukčním prostředí, kdežto larva je závislá na přísunu kyslíku. I přes výmluvnost, s jakou fotografie ilustruje možnou míru zostření gradientu redukčního potenciálu, stále nemůžeme usuzovat, jak strmé jsou gradienty na škálách blížících se rozměrům bakterií a archeí.

Proto je nemožné striktně rozlišit, zda prostředí selektuje složení mikrobiální komunity, či zda naopak komunita vytváří specifické prostředí. Oba procesy jdou spolu ruku v ruce zároveň. Rozmanitost minerálů na povrchu Země, stejně jako jejich relativní zastoupení, se v průběhu více než 4,5 miliardy let od vzniku planety dramaticky vyvíjí prostřednictvím fyzikálních, chemických a v posledních 2,5 miliardy let také biologických procesů. Jednou z největších změn byl vznik kyslíkové atmosféry a ustavení vertikálního redoxního gradientu ve svrchní vrstvě litosféry. Biota ustavuje lokální i globální gradienty a dává tak vzniknout ohromné diverzitě minerálů (Hazen et al. 2008). V současné době (srpen 2016) je popsáno 5 161 minerálů a ročně jich je nově popsanych více než 100 (<http://rruff.info/ima/> 2016).

Je zásadní otázkou, zda lze na běžných vzorkovacích škálách ještě brát prokaryota jen jako univerzální katalyzátory, které umožňují či urychlují reakce, jež jsou za daných termodynamických podmínek energeticky preferované, či zda čistě biologické procesy, jako je např. rozdílný vývoj komunit vlivem rozdílné historie náhodného osidlování, povedou k naprosto odlišným konečným stavům neživé složky. To by znamenalo, že nelze mikroorganismy brát jen jako univerzální katalyzátory, neboť konečný stav systému není determinován jeho počátečním stavem, nýbrž i jeho historií.

Rovněž zostřováním gradientů může být v malých objemech dosaženo natolik extrémních podmínek, že to ovlivní i konečný produkt metabolických reakcí. To je pravděpodobně případ i realgaru na Mokrsku, kde se nám nepodařilo běžnými vzorkovacími metodami najít prostředí, ve kterém by byl realgar termodynamicky stabilní.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje

Cykler TouchGene gradient (Techne), cykler XP (Bioer), regulovatelný zdroj stejnosměrného proudu Power station 300 (Labnet), sada mechanických pipet Eppendorf pipet (Eppendorf), stolní centrifuga Minispin Plus (Eppendorf), termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf), trans-iluminátor TCP-20-MC (Vilber Lourmat), váhy ABC plus 600H (ADAM Equipment), vortex MS1 minishaker (IKA),

Transmisní elektronový mikroskop (HRTEM) a mikroanalýzátor JEOL JEM-3010 (Centrum instrumentálních technik – laboratoř elektronové mikroskopie, Ústav anorganické chemie AV ČR), skenovací elektronový mikroskop TESCAN VEGA3XMU (Oddělení analytických metod, Geologický ústav AV ČR), transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011 (Laboratoř elektronové mikroskopie, PŘF-UK), skenovací elektronový mikroskop JEOL 6380 LV (Laboratoř elektronové mikroskopie, PŘF-UK).

3.2 Chemikálie

LA PCR buffer complete (Top-Bio, Brno), LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio, Brno), dNTP Mix (10 mM each) (Thermo Fisher Scientific), primery (Sigma-Aldrich), PCR H₂O (Top-Bio, Brno), DMSO (Top-Bio, Brno), azid sodný (Sigma), ampicilin (Biotica), streptomycin (Biotica), octan sodný (Penta), mléčnan sodný (Sigma), tris(hydroxymethyl)amino methan (Sigma), EDTA (Sigma), kyselina boritá (Penta), ethanol (Penta), glycerol (Lachema), BFM (Sigma), Gelred (Biotium), agarosa (Sigma), N₂ (Linde Gas).

3.2.1 Roztoky

TBE pufr - 89 mM Tris.HCl; 89 mM kyselina boritá; 2 mM EDTA; pH 8,0

Vzorkový pufr - 50% glycerol; 0,13 M EDTA; 0,12% bromfenolová modř; pH 8,0

3.3 Odběr vzorků

Na čerstvě odhaleném profilu byla vytipována místa odpovídající jendoznačně rozlišitelným půdním zónám. Odběr byl proveden ocelovou špachtlí sterilizovanou v plameni. Půdní vzorky (cca 200 mg) byly vloženy do lyzační zkumavky (ZR BashingBead™ Lysis Tube) s pufrem a ihned 3 min. intenzivně vortexovány. Po převozu do laboratoře byly lyzované vzorky skladovány v +4 °C až do zpracování, maximálně 11 dní. Vzorky dřeva (RE) byly odebrány ve větších kusech do sterilní 15ml falkonky a do kitu převedeny až v laboratoři s ohledem na minimalizaci rizika kontaminace půdou ulpívající na povrchu dřeva.

Bezprostředně po odběru vzorků pro izolaci DNA byly z míst co nejbližších místu odběru reprezentativních vzorků odebrány přibližně 3 g materiálu pro rozbor TOC a celkové síry.

Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly odebrány do fixáže (viz níže).

3.4 Izolace DNA

Izolace DNA byly prováděny v laminárním boxu v sériích po náhodně volených šesticích kitem ZR Xpedition soil/fecal™ (Zymo Research) podle manuálu.

3.5 PCR

Reakční směs primární PCR (Tabulka 1) byla namíchána v laminárním boxu v triplikátech po 25 µl a DNA amplifikována v 30 cyklech (Tabulka 2). Použity byly primery U5415F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) a U1406R (GACGGGCGGTGTGTRCA) (Turner et al. 1999).

Tabulka 1: Složení reakční směsi PCR.

PCR pufr	2,5 µl
DMSO	0,5 µl
dNTP	0,25 µl
F primer	0,25 µl
R primer	0,25 µl
polymeráza	0,15 µl
templát	0,5 µl
voda	20,6 µl

Tabulka 2: Cyklus PCR

počáteční denaturace	90 °C	2 min
denaturace	90 °C	20 s
nasedání primerů	55 °C	30 s
amplifikace	68 °C	40 s

Amplifikát byl pro každý vzorek smísen a elektroforeticky přečištěn. Příslušné oblasti odpovídající zóně migrace požadovaného PCR produktu byly vyřezány a DNA extrahována. V dalším kroku byla DNA jednotlivých vzorků v deseti cyklech označena tagovanými primery. Reakční podmínky byly použity stejné, jako v primární PCR.

Pro sekundární PCR byly použity tyto R primery:

vzorky A	ACTAGGGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT	806R_T115
vzorky B	ATAGCCGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT	806R_T119

F primery obsahovaly společnou část GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, které předcházely tagy v tabulce 3.

Tabulka 3: Tagy na primerech pro sekundární PCR.

F01	ATATAC	F19	ATCATC
F02	ATATCA	F20	ATCACT
F03	ATATGT	F21	ATCAGA
F04	ATACAT	F22	ATCTAT
F05	ATACTA	F23	ATCTCG
F06	ATACGC	F24	AGCTGA
F07	ATAGAG	F25	ATCGAC
F08	ATAGTC	F26	ATCGTG
F09	ATAGCT	F27	ATCGCA
F10	ACTATG	F28	ATGATA
F11	ACTACA	F29	ATGACG
F12	ACTAGC	F31	ATGTAG
F13	ACTCAG	F32	ATGTCT
F14	ACTCTC	F33	ATGTGC
F15	ACTCGT	F34	ATGCAC
F16	ACTGAT	F35	ATGCTG
F17	ACTGTA	F36	ATGCGA
F18	ACTGCG		

3.6 Elektroforéza v agarosovém gelu

Elektroforéza byla prováděna v 1% agarosovém gelu v TBE, barveném gelred v ředění 10 000x, při napětí 15–17 V/cm. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům v objemovém poměru 5:1. Byl použit standard molekulových hmotností Gene Ruler DNA Ladder Mix.

3.7 Extrakce DNA z agarosového gelu

Vzorek byl rozdělen na standardním agarosovém gelu barveném gelred a prohlížen na UV transiluminátoru. Požadovaný fragment byl svižně vyříznut skalpelem s ohledem na minimalizaci expozice UV světlu a přenesen do mikrozkuřavky. Extrakce DNA z gelu byla provedena pomocí kitu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) podle manuálu.

3.8 Sekvenace

Sekvenace proběhla technologií Illumina MiSeq v režimu 2 x 250 bp v Laboratoři environmentální mikrobiologie MBÚ AV ČR. Pracovníci laboratoře odstranili sekvenace s nevyhovující kvalitou (průměrná kvalita bází <30) a spojili párové konce v programu *fastq-join* (Aronesty 2013).

3.9 Zpracování sekvencí

Data získaná ze sekvenátoru byla zpracovávána v programu Seed (Větrovský and Baldrian 2013), využívajícího několik podprogramů pro různé specifické úlohy. Sekvenace byly roztříděny

podle příslušnosti k jednotlivým vzorkům, označení vzorků bylo vneseno do názvů sekvencí a byly smazány primery a tagy. Rozdělení do operačních taxonomických jednotek (OTU) na 97% hladině podobnosti bylo provedeno programem UPARSE (Edgar 2013), který zároveň odstraňuje chimerické sekvence. Sekvence rozdělené podle OTU byly alignovány programem MAFFT (Katoh et al. 2009) a pro jednotlivé OTU byly vygenerovány konsenzuální sekvence obsahující na každé pozici nejčastější bázi v dané OTU.

3.10 Bioinformatická analýza

Konsenzu dvou tisíců nejhojnějších OTU byly porovnány programem BLAST (Altschul et al. 1997) s mezinárodní databází GenBank. Genotypy s atypickými výsledky, tedy vykazující nízkou shodu s databází, shodu s jiným genem než 16S rDNA, eukaryotické sekvence, shoda s genotypy typickými pro mikrobiotu lidského těla (různé strepto- a stafylokoky, *Propionibacterium acnes* apod.) a známými kontaminanty PCR (např. *Pelomonas puraquae*, *Herbaspirillum* sp., *Janthinobacterium svalbardensis*, *Acidovorax avenae*, *Escherichia coli*) byly odstraněny jako potenciální kontaminace. Ponechány byly sekvence 16S rDNA bakterií a archeí. Pro účely potlačení potenciálně falešné diverzity generované chybami sekvenace a pro rychlejší konstrukci fylogenetického stromu byly rovněž odstraněny všechny OTU vzniklé z jediné sekvence (singletony).

Konsenzu byly opět alignovány programem MAFFT, byly ručně odstraněny pozice tvořené převážně mezerami nebo zjevně neztotožnitelné úseky. Fylogenetický strom byl zkonstruován v programu RAxML (Stamatakis 2014) s modelem GTRCAT. Tento strom, doplněn o tabulku četností OTU ve vzorcích a tabulku vlastností a parametrů jednotlivých vzorků, byl použit pro konstrukci datasetu pro balíček *Phyloseq* (McMurdie and Holmes 2013) ve statistickém prostředí R (R Core Team 2016).

Matice distancí byla zkonstruována v programu Mothur (Schloss et al. 2009) váženou variantou algoritmu UniFrac (Lozupone and Knight 2005). Mothur umožňuje jackknife, neboli opakovaný výpočet pro náhodnou podmnožinu sekvencí. Z variance výsledných vzdáleností lze pak usuzovat na přesnost analýzy. Výslednou matici tvoří střední hodnoty vzdáleností a k ní je přiřazena matice standardních odchylek. My jsme provedli tisíc opakování a v každém redukovali dataset na stejný počet sekvencí na vzorek (3 700). Distanční matice vzorků se stala základem pro PCoA i UPGMA strom v balíčku *Phyloseq* v R. Pro orientační fylogenetickou analýzu byly vybrány OTU, které byly v alespoň jednom vzorku zastoupeny alespoň 1 % všech sekvencí. Četnosti těchto OTU jsou zobrazeny v heatmapě na logaritmické barevné škále. Zda vzorky klastrují v rámci domén, bylo na UniFrac datech ověřeno analýzou molekulárního rozptylu (AMOVA) v programu Mothur. Za signifikantní byla považována hodnota $p < 0,01$ při 1 000 randomizací.

3.11 Obsah uhlíku a síry

Z každé domény byly odebrány min. tři nezávislé vzorky na stanovení TOC a celkové síry. Vzorky byly odebrány z těsného okolí vzorků pro izolaci DNA a až do analýzy byly uchovávány v -20 °C. Analýza proběhla v laboratořích geologické sekce Přf UK na analyzátoru ELTRA CS 530 total carbon analyzer a ELTRA CS 500 total inorganic carbon analyzer. Závislost obsahu C a S na příslušnosti k doméně byla testována analýzou rozptylu (ANOVA) na logaritmovaných datech. Pro určení signifikance rozdílu mezi jednotlivými doménami byl použit post hoc Tukeyho test. Analýza proběhla v prostředí R (R Core Team 2016).

3.12 Inkubace

Inkubační experimenty probíhaly v půllitrových vzduchotěsně uzavřených lahvích v autochtonní mokřské vodě, odebrané lyzimetry z půdy. Podmínky jednotlivých inkubací shrnují tabulky ve výsledcích. Založení inkubací probíhalo nesterilně. Hrdlo bylo uzavřeno gumovým septem. Počáteční anoxie byla ustanovena probubláváním dusíkem po dobu tří minut. Odběr roztoku pro případnou analýzu v průběhu inkubace byl realizován injekční jehlou přes septum a odebraný objem byl kompenzován inertním plynem (dusíkem či argonem). Inkubace probíhaly ve tmě za laboratorní teploty.

3.13 Krystalizační experimenty *in situ* – excalibur

Abychom alespoň orientačně zjistili, jaká je doba potřebná pro vysrážení viditelného množství realgaru na dřevě, zatloukli jsme do břehu zkoumané vodoteče tři suché habrové větve (asi 10 cm silné) do hloubky cca 120 cm. Po roce jsme dvě z nich vytáhli a vizuálně analyzovali. Třetí větev nebyla nalezena. Vzhledem k technickým obtížím při jejich vyzvedávání (Obrázek 11) je budu dále v textu označovat jako excalibur.



Obrázek 11: Vytahování excaliburu.

3.14 Světelná mikroskopie, SEM (+ EDS), HRTEM

Odpověď na otázku, zda je srážení realgaru nějak asociované s konkrétní strukturou dřeva, třeba přímo s buňkami bakterií, jsme hledali různými mikroskopickými technikami. Od světelné mikroskopie přes skenovací elektronovou mikroskopii, až po transmisní elektronovou mikroskopii, kombinovanou s prvkovou analýzou EDS (energy dispersive x-ray spectroscopy), elektronovou difrakcí SAED a strukturní analýzou HRTEM (high resolution TEM). Vzorky pro světelnou mikroskopii byly pouze usušeny. Vzorky pro SEM byly kromě toho ještě vakuově napařeny vrstvou uhlíku. Vzorky pro TEM byly po odběru ihned fixovány 2,5% glutaraldehydem v 0,1M arsenátovém pufru a předány ke zpracování v Laboratoři elektronové mikroskopie PŘF UK. Zde byly vzorky postfixovány 2% OsO₄, dehydrovány acetonovou řadou a ze 100% acetonu převedeny do pryskyřice a zality. Poté byly vzorky krájeny na ultramikrotomu a kontrastovány v octanu uranilu a citrátu olovnatém. U vzorků určených pro mikroanalýzu (EDS) byl místo arsenátového pufru použit fosforečnanový a postfixace a kontrastování octanem uranilu a citrátem olovnatým bylo vynecháno.

3.15 Identifikace minerálních fází

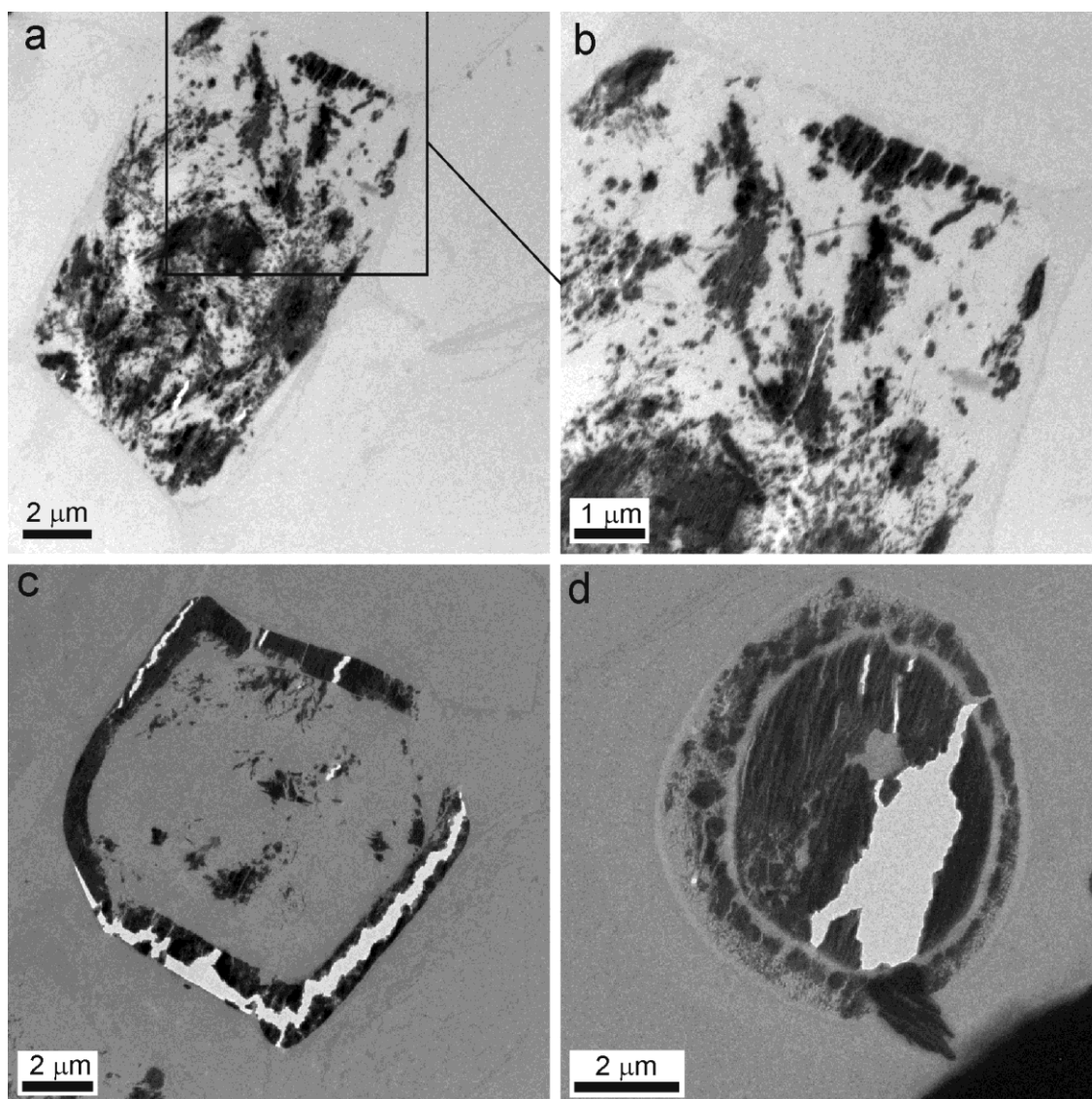
Makroskopická množství minerálů obsažených ve vzorcích nebo vzniklých při inkubacích byly identifikovány pomocí rentgenové difrakce (XRD) na přístroji PANalytical X'Pert Pro diffractometer při CuK α radiaci (40 kV, 30 mA, skenovací krok 0.02°/200 s v rozpětí 5-70° 2 θ). Mikroskopické minerály nalezené při rozborech inkubačních experimentů byly přibližně identifikovány podle prvkového složení zjištěného pomocí SEM-EDS.

4 Výsledky

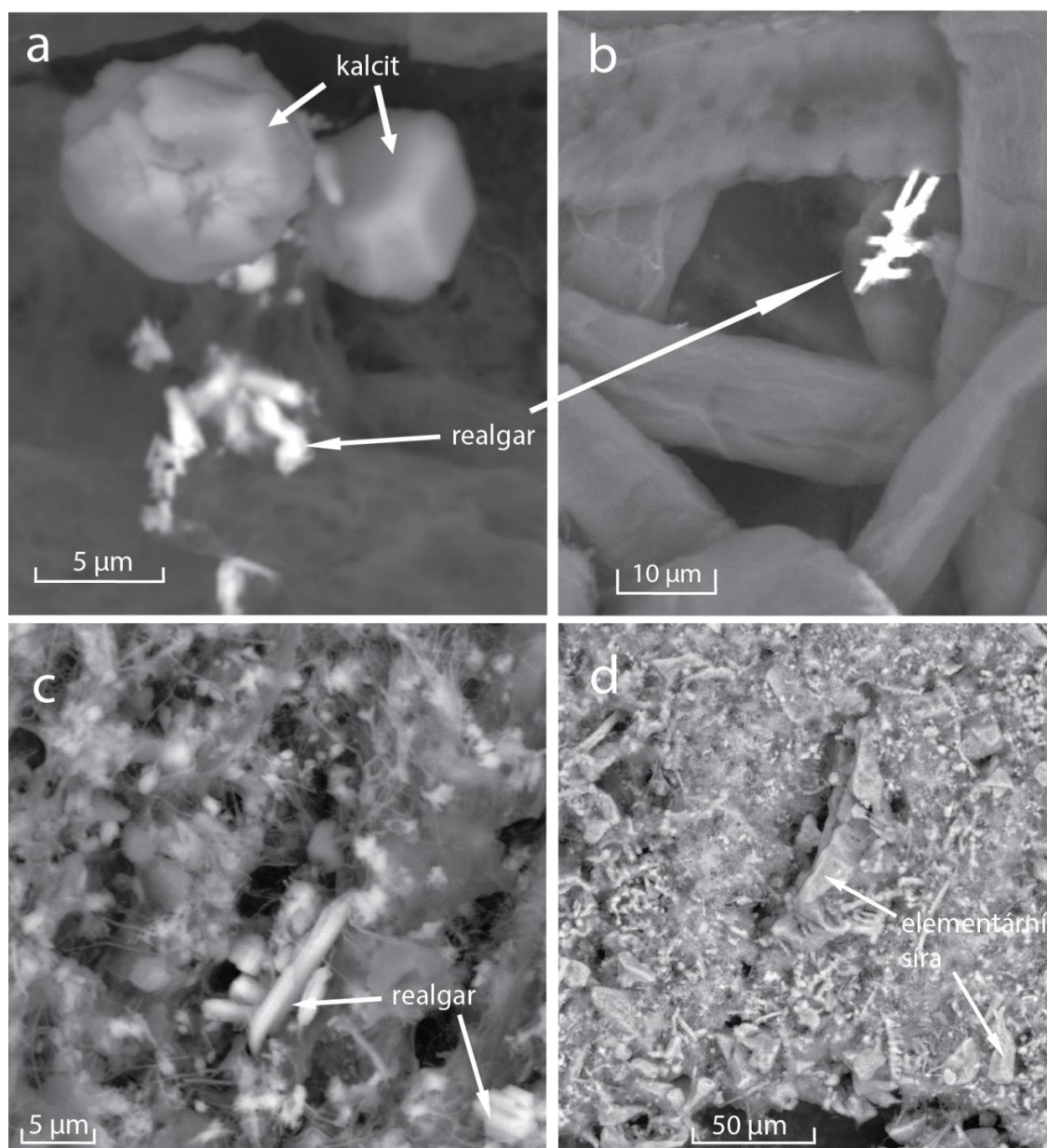
4.1 Výskyt realgaru

Viditelné nánosy realgaru byly vždy nacházeny pouze na velkých kusech mrtvého organického materiálu. Typicky na dřevě, ale i na svazcích houbových vláken (Obrázek 14), nebo na kořenech bylin. Realgarem inkrustované kusy dřeva se obvykle nacházejí v uhlíkem bohaté a silně redukované vrstvě v hloubce kolem 80 cm. Tato dřevní hmota byla identifikována jako převážně olšové větve (Bobek 2013, osobní sdělení), nicméně z inkubačních experimentů a experimentů s exalibury je zřejmé, že se realgar stejně ochotně sráží i na dřevě bezu, šípku či habru.

Realgar se může srážet na povrchu dřeva (Obrázek 14, Obrázek 15), uvnitř buněk, nebo může inkrustovat buněčnou stěnu (Obrázek 12). Inkubace 3.3 (viz dále), kde byl kousek dřeva zabalen do buničiny, prokázala, že dřevo při srážení realgaru nejspíš nehraje nukleační úlohu, neboť byl realgar prokázán i ve vrstvách buničiny, které se dřeva nedotýkaly (Obrázek 13a, b).



Obrázek 12: Mineralizace dřevní hmoty realgarem (Drahota et al.): (a, b) akumulace realgarových agregátů uvnitř buňky, (c) akumulace v buněčné stěně a (d) akumulace realgaru v lumen traieidy. TEM, identifikace realgaru EDS a SAED.



Obrázek 13: SEM – inkubace 3.3 (a, b) a 3.1 (c, d). Realgar se sráží i na povrchu papíru, který se přímo nedotýkal klacku (a, b). Zároveň zde krystalizuje kalcit (a), z čehož lze usuzovat na probíhající respirativní metabolismus a produkci CO₂. V malém množství se nám podařilo realgar vyprodukovat i v jedné inkubaci bez inhibice (c). Zároveň se v této láhvi na hladině vysrážela elementární síra (d). Identifikace minerálů pomocí EDS (a, b, c, d) a XRD (d).

4.2 Rychlost biogenního srážení realgaru

Na rychlost vzniku makroskopických agregátů realgaru ukazuje v hrubém měřítku historie lokality. Velké kusy dřevní hmoty, na nichž se realgar sráží především, byly do břehu vodoteče nejspíš pohřbeny při provádění odvodňovacích prací na okolních polích v roce 1980 (Kulhavý 2014). To by ukazovalo na dobu vzniku do třiceti let. Indicie o ještě kratší době vzniku přidaly nálezy tenkých kořenů bylin a svazků houbových vláken zcela pokrytých realgarem (Obrázek

14). Předpokládáme, že takto subtilní struktury podléhají rozpadu v řádu jednotek roků, a hromadění realgaru tedy nemůže trvat déle.

Ještě přesnější odhad doby potřebné ke vzniku realgarových nánosů přinesl pokus o vysrážení realgaru na dřevě čerstvě pohřbeném v rámci experimentu. Na povrchu obou větví byly už od místa odpovídajícího hloubce 20 cm pod povrchem (přibližně hladina podzemní vody) jasně rozeznatelné nánosy realgaru, jejichž morfologie prakticky vylučuje vznik otěrem ze starších akumulací náhodně zasažených v půdě (Obrázek 15, Obrázek 10).

Výsledky třetí série inkubačních experimentů prokázaly vznik viditelného množství realgaru na dřevní hmotě už za 4 měsíce.



Obrázek 14: Zachovalé svazky houbových hyf pokryté realgarem. Vysrážený realgar jsme našli i na jemných kořenech bylin a na rhizomorfách hub. Doba potřebná pro vznik nánosů realgaru musí tedy být rozhodně kratší, než čas potřebný k rozpadu těchto subtilních struktur.

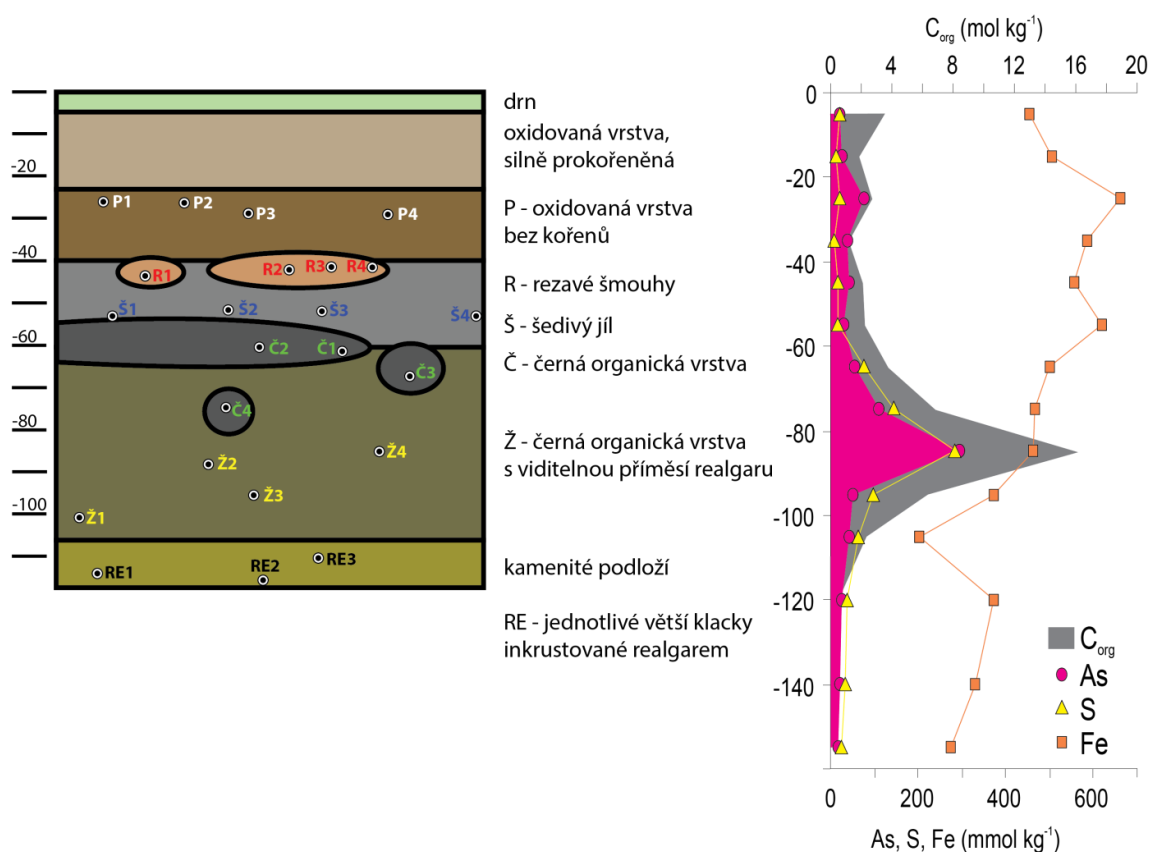


Obrázek 15: Nánosy realgaru, které se vysrážely na habrové větvi, jež byla rok vystavena podmínkám realgarových ložisek v sedimentu mokřského potoka. Přiložené měřítko zobrazuje hloubku pod terénem. 20 cm zhruba odpovídá hladině podzemní vody.

4.3 Pedologie, rozlišené redox domény

Pro účely mikrobiologického vzorkování jsme vykopali dva půdní profily, v nichž se nám podařilo vizuálně rozlišit několik jednoznačných vrstev a domén (**Obrázek 21**). Od nich je odvozených šest typů odebraných vzorků environmentální DNA. Vzorkováním jsme se snažili obsáhnout redoxní gradient od oxidované půdy nad hladinou spodní vody (P) přes rezavě zabarvené domény, kde probíhá oxidace železa vyplavovaného ze spodnějších vrstev (R), šedavou redukovanou jemnozrnnou vrstvou s malým obsahem organického uhlíku (Š), až po velmi redukční a na organiku bohatou vrstvu viditelně prorostlou drobnými akumulacemi realgaru (Ž), nebo jen černou bez realgaru (Č). V těchto vrstvách jsme rovněž našli větší kusy dřevní hmoty pokryté realgarem. Z jejich vnitřního prostředí pocházejí vzorky RE.

Na lokalitě bylo provedeno pedologické hodnocení dvou nezávislých profilů RNDr. Vitém Penížkem, Ph.D. (ČZU), které dobře koresponduje s doménami, jež jsme pro účely mikrobiologického vzorkování rozlišili my v našich odběrových profilech (**Tabulka 11**). Pedologické profily byly na našich nezávislé, avšak těsně s nimi sousedily. Pedologické hodnocení bylo doplněno prvkovými analýzami, které ukazují velké nabožení sírou, arsenem a organickým uhlíkem v hloubce kolem 80 cm, která odpovídá doméně Ž (**Obrázek 16**).



Obrázek 16: Srovnání jednoho z našich odběrových profilů s chemickými analýzami z jednoho z pedologických profilů, který s ním přímo sousedí.

4.4 Obsah uhlíku a síry v rozlišených doménách

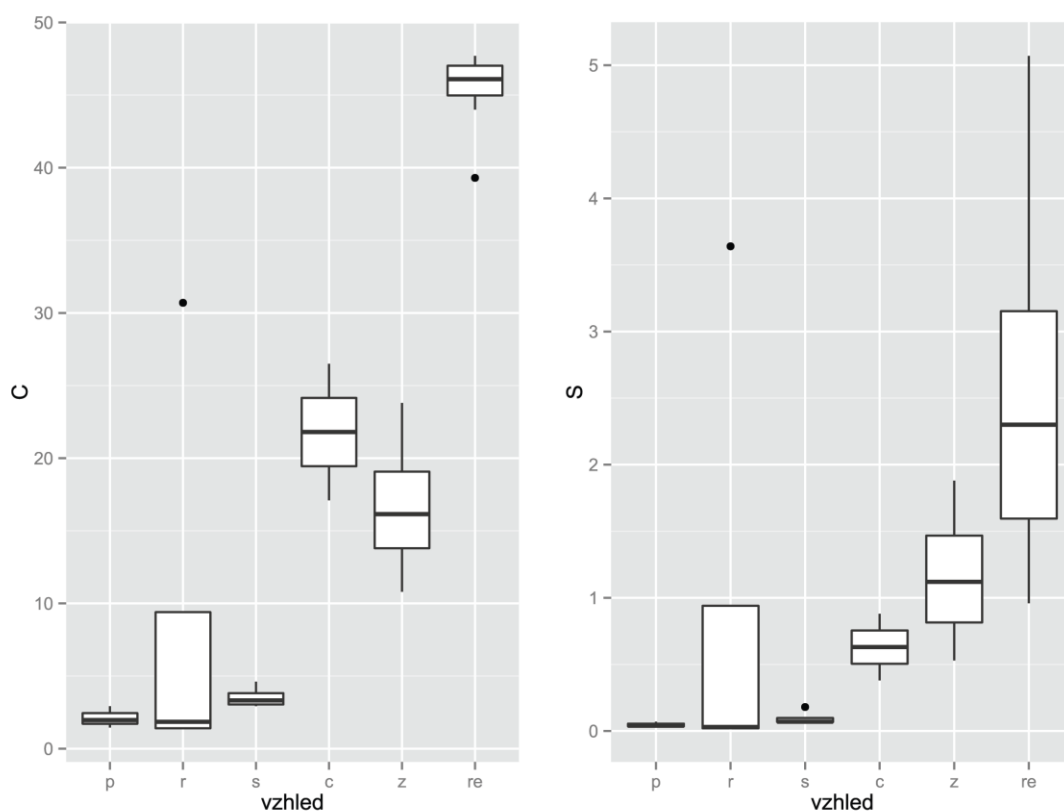
Obsah síry a uhlíku v zónách profilů, z nichž byly odebírány mikrobiologické vzorky (Obrázek 17), je signifikantně odlišný ve vzorkovaných doménách (ANOVA: $p_s = 8,6 \cdot 10^{-5}$; $p_c = 8,8 \cdot 10^{-7}$). Podle obsahu síry se dají domény rozdělit do dvou distinktních klastrů (P, R, S, C – Z, RE) a podle TOC rovněž do dvou klastrů (P, R, S – C, Z, RE), jen s malou změnou (Tabulky 4 a 5).

Tabulka 4: *p* hodnoty pro rozdílnost domén v obsahu celkové síry (Tukeyho test). Zvýrazněná jsou políčka dvojic, které jsou na 5% hladině signifikantně odlišné.

síra	P	R	S	C	Z	RE
P	1					
R	0,961	1				
S	0,966	1	1			
C	0,159	0,394	0,381	1		
Z	0,0146	0,049	0,0461	0,988	1	
RE	0,0006	0,00159	0,00148	0,645	0,871	1

Tabulka 5: *p* hodnoty pro rozdílnost domén v obsahu TOC (Tukeyho test). Zvýrazněná jsou políčka dvojic, které jsou na 5% hladině signifikantně odlišné.

uhlík	P	R	S	C	Z	RE
P	1					
R	0,876	1				
S	0,861	1	1			
C	0,006	0,032	0,034	1		
Z	0,0041	0,025	0,027	0,995	1	
RE	0,000008	0,000024	0,000027	0,65	0,119	1



Obrazek 17: Obsah uhlíku a síry v rozlišených doménách (hm. %).

4.5 Inkubace

První série (Tabulka 6) – Do každé láhve byly do cca 0,5 l vody přidány dva 1cm kusy větviček nalazených v anoxickém bahně mokrského rybníčku (vodní plocha napájená zkoumanou vodotečí). Jako původní dřevina použitých větví byl určen bez a šípek. Oba kusy byly pečlivě prohlédnuty na přítomnost realgaru. Na šípku byly nalezeny nepatrné stopy realgaru, které byly odstraněny. Testován byl vliv dodání nefermentovatelného substrátu (10 mM laktát). K oběma možnostem byly sestaveny i kontrolní inkubace sterilizované azidem sodným (0,01 %).

Tabulka 6: První série inkubací.

Číslo láhve	přidané látky	realgar
1.1		0
1.2	azid	1
1.3	10 mM laktát	0
1.4	10 mM laktát + azid	1

Po třech dnech se ve všech láhvích vytvořil mléčný zákal a vizuálně se láhve stabilizovaly. Po čtyřech měsících byla na dřevě v obou sterilizovaných láhvích spatřena žlutá sraženina. Už při otevření lahví bylo podle čichu zřejmé, že azid rozhodně nezabil všechny mikroorganismy a že i v domněle mrtvých kontrolách dochází k redukci síranů. Rentgenová difrakce potvrdila, že žlutá sraženina je realgar.

Druhá série (Tabulka 7) – 10mM laktát vápenatý, 0,5 l vody, 2 kousky klacků, všechny lahve probublávány 3 min dusíkem skrze dlouhou jehlu.

Tabulka 7: Druhá série inkubací.

Číslo láhve	přidané látky	realgar	vzorky DNA
2.1	ampicilin 650 µl (150 mg/ml)	1	i2amp
2.2	streptomycin 650 µl (100 mg/ml)	1	i2str
2.3	azid 2,5 ml 10% roztoku	0	
2.4	azid 0,5 ml 10% roztoku	1	i2az4
2.5	azid 2,5 ml 10% roztoku	0	
2.6		0	i20

Po deseti měsících byla v obou lahvích inhibovaných antibiotikem spatřena na dřevě žlutá sraženina. Tyto inkubace (2.1, 2.2) byly ukončeny a analyzovány. Inkubace 2.4 byla ukončena

po sedmnácti měsících, kdy se v ní objevila viditelná žlutá hmota na povrchu dřeva (realgar, prokázán XRD a EDS-SEM). V šesté lahvi (bez inhibice) panovaly sice redukční podmínky, ale realgar nebyl nalezen, kdežto třetí a pátou láhev se zřejmě podařilo dokonale sterilizovat a nejevily známky jakéhokoli metabolismu.

Třetí série (Tabulka 8) – 10mM acetát, v každé láhvi kus dřeva. Testována byla nukleární role dřeva.

Tabulka 8: Třetí série inkubací.

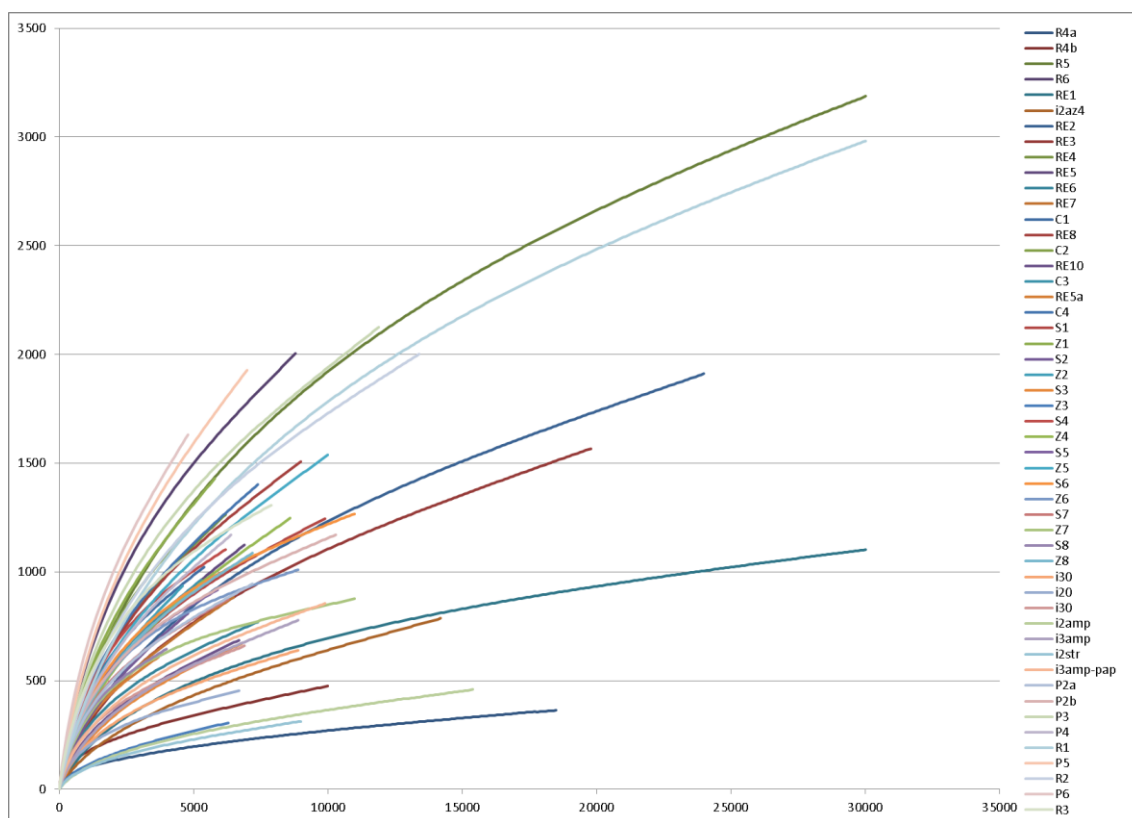
Číslo láhve	přidané látky	realgar	vzorky DNA
3.1		1	i30 (duplikovný)
3.2	ampicilin 650 μ l (150 mg/ml)	1	i3amp
3.3	ampicilin 650 μ l (150 mg/ml), jeden klacek zabalený v buničině, jeden volně	1	i3amp-pap

Inkubace byly ukončeny po čtyřech měsících. Realgar byl tentokrát objeven v malém množství i na dřevě z láhve bez inhibice (3.1), a to na styčné ploše se stěnou láhve a v puklinách (Obrázek 13c). Zároveň se na hladině v této láhvi vysrážela elementární síra (identifikace XRD, EDS). V druhé láhvi byl realgar na dřevě přítomen v dobře rozeznatelném množství. Ve třetí láhvi byly krystaly realgaru nalezeny pouze v buničině, kterou byl klacek obalen. Na dřevě se nám realgar nalézt nepodařilo.

4.6 Sekvenace

Pro sekvenaci bylo vybráno 40 vzorků ze dvou půdních profilů z lokality a 8 vzorků dřeva z inkubací. Tři vzorky (P2, R4, RE5) byly zpracovány duplikovaně.

Ze sekvenační laboratoře jsme obdrželi cca 608 tisíc sekvencí 16S rDNA. Po odstranění chimerických sekvencí nám jich zbylo 523 tisíc rozdělených do 17 511 OTU. Byly zkonstruovány křivky pokrytí diversity (Obrázek 18). Přibližně polovina OTU byly singletony (OTU zastoupené jednou sekvencí). Ty jsme pro účely rychlejší konstrukce fylogenetického stromu odstranili. Ze dvou tisíců nejhojnějších OTU jsme na základě srovnání s mezinárodní databází GenBank programem BLAST (Altschul et al. 1997) vyřadili 18 OTU, které jsme identifikovali jako zjevné kontaminace PCR (9 OTU, 11 262 sekvencí), chloroplasty (3 OTU, 53 sekvencí), mitochondrie (6 OTU, 144 sekvencí).



Obrázek 18: Křivky pokrytí diversity pro jednotlivé vzorky. Vodorovně počet sekvencí, svisle počet OTU.

4.7 UniFrac

Z konsenzuálních sekvencí všech OTU, kromě singletonů, by konstruován fylogenetický strom, na jehož základě byly vypočítány fylogenetické vzdálenosti vzorků.

Ze vzájemných UniFrac vzdáleností vzorků byla sestavena distanční matice a podle ní PCoA ordinace (Obrázek 19). Vzorek z druhé inkubace inhibovaný ampicilinem je extrémně divergentní. Proto jsme PCoA ordinaci zopakovali ještě pro dataset, ze kterého byl tento vzorek vynechán, abychom rozlišili patrnosti jinak skryté.

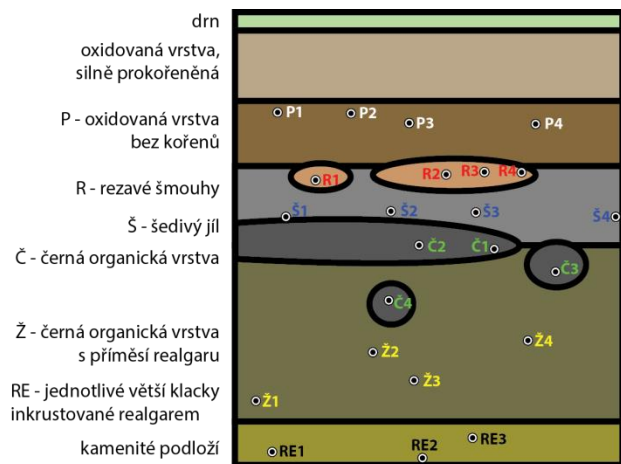


Obrázek 19: PCoA distancí UniFrac. Nahoře celý dataset a dole to samé bez vzorku i2amp (ampicilinem inhibovaná inkubace z druhé série). Nejistota vzorku je zde součet standardních odchylek všech vzájemných vzdáleností s ostatními vzorky v tisícinásobném jackknife podvzorkování.

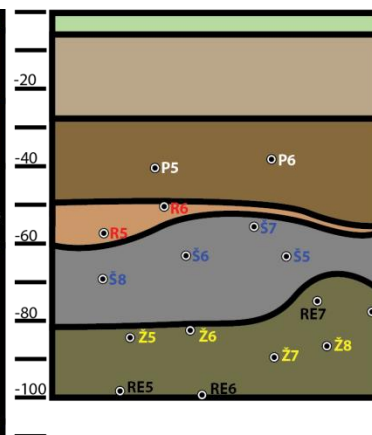
Tabulka 10: Přehled doplňkových komunit z jiných lokalit. CN = Černuc, JO = štola Josef na Mokrsku, SH = Shobov. Struktura: 1 = voda + biofilm, 2 = voda + sediment, 3 = půda.

označení	lokalita	struk- tura	elektronové donory	elektronové akceptory	popis
MC1 voda	CN	1	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	převážně anoxická podzemní voda z vrtu v horninách stáří cenoman až turon (pískovce, prachovce a jílovce s obsahem zuhelnatělé rostlinné hmoty)
MC1 kal	CN	3	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	sediment z téhož vrtu
MC6 voda	CN	1	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	převážně anoxická podzemní voda z vrtu v horninách stáří cenoman až turon (pískovce, prachovce a jílovce s obsahem zuhelnatělé rostlinné hmoty)
MC6 kal	CN	3	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	sediment z téhož vrtu
PES 10	CN	1	C_{org} , Fe^{2+}	O_2	oligotrofní voda z jímacího vrtu vystrojeného ocelovou pažnicí v kvartérních sedimentech
PES dno	CN	3	C_{org} , Fe^{2+}	O_2 , Fe^{3+}	sediment z téhož vrtu
MO5	CN	2	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	převážně anoxická podzemní voda a kal z vrtu v horninách svrchní křídly
MO3	CN	2	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	převážně anoxická podzemní voda a kal z vrtu v horninách svrchní křídly
MO1	CN	2	C_{org} , Fe^{2+} , S^{2-}	O_2 , Fe^{3+} , sírany, dusičnany	převážně anoxická podzemní voda a kal z vrtu v horninách svrchní křídly
MOšt	CN	3	C_{org}	O_2	minerální sediment v jímací štole na pitnou vodu, prorostlý kořeny stromů
VITA	JO	1	S^{2-}	(O_2)	sulfidická podzemní voda v puklinovém prostředí ložiska Mokrsko cca 100 m pod povrchem, vrt chráněný před pronikáním kyslíku z atmosféry
HV1	JO	2	S^{2-} , C_{org}	O_2 , síran	podzemní voda z ložiska Mokrsko, vertikální vrt syčený kyslíkem pomocí difuze
SH	SH	3	C_{org}	O_2	minerální materiál z vyloužené zóny haldy, hloubka cca 10 cm pod povrchem, převážně křemen a jílové minerály
H	JO	2	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře
K1	JO	1	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře, Mokrsko
K2	JO	1	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře
S0	JO	1	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře
S1	JO	1	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře
T1	JO	1	S^{2-} , C_{org}	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře
T2	JO	1	S^{2-} , (C_{org})	O_2	výtok sulfidické podzemní vody volně vystavený atmosféře

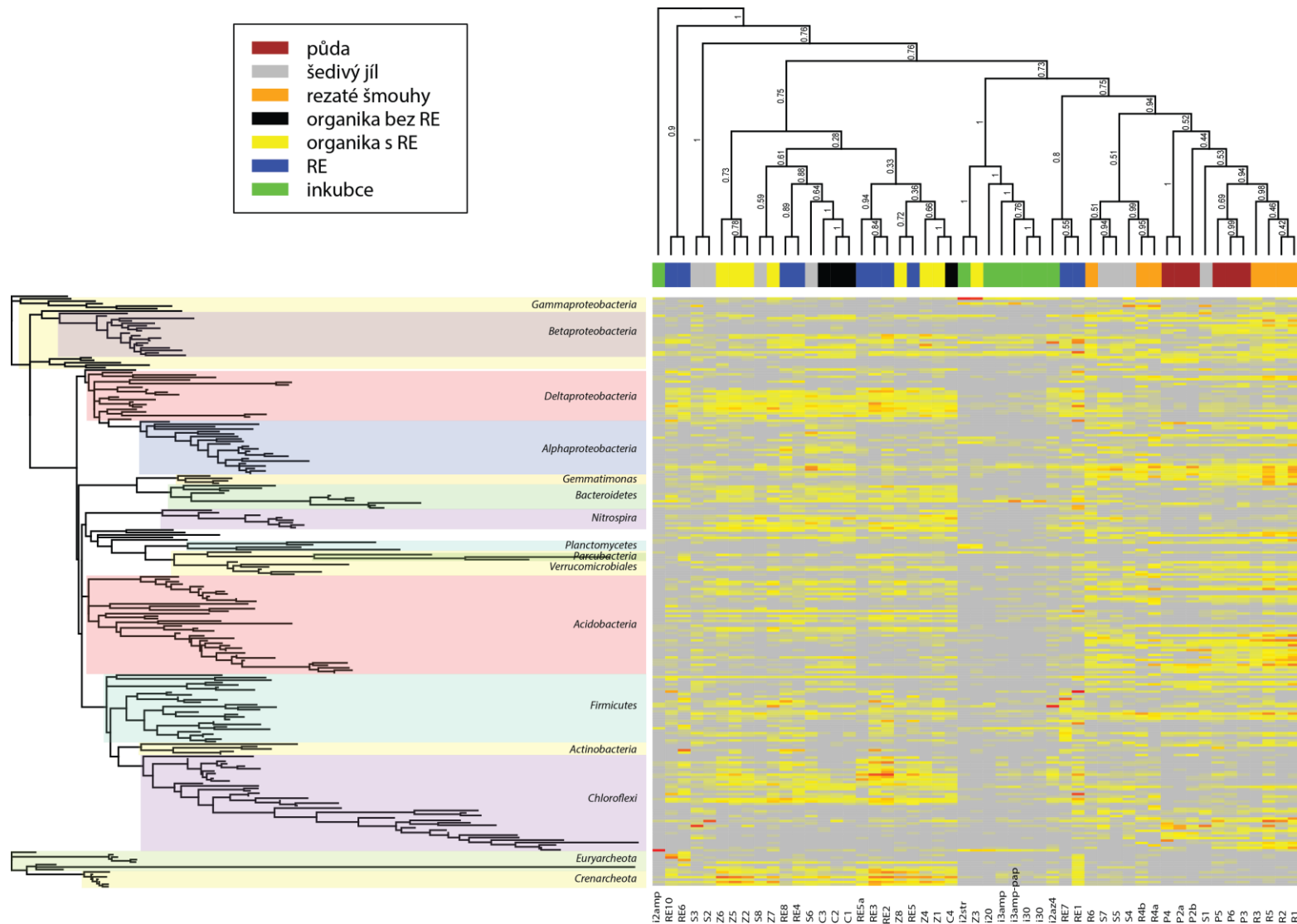
Profil 1



Profil 2



Obrázek 21: Profil 1 a profil 2
s vyznačenými vrstvami a
odebranými vzorky environmentální
DNA. Schémata jsou překreslena
přesně. Vyznačená hloubka je
v centimetrech. Na fotografiích jsou
místa odběru vzorků vyznačena
napínáčky, jejichž barva odpovídá
barvám na schématech. Fotografie
nejdou pořízené kolmo na profil, a
vzdálenosti jsou na nich proto
perspektivně zkresleny.



Obrázek 22: Heatmapa relativního zastoupení hojných OTU (alespoň 1 % sekvencí v alespoň jednom vzorku). Vertikálně konsenzuální UPGMA strom UniFrac vzdáleností vzorků (konstruován na základě celého datasetu s tisíckrát opakovaným jackknife podvzorkováním), horizontálně fylogenetický strom podle 16s rDNA s větvemi přibližně zařazenými do kmenů porovnáváním s databází GenBank.

Tabulka 11: Výsledky pedologického hodnocení a prvkové analýzy (hm. %) nezávislého profilu.

cm	horizont	morfologie	realgar	Munsell	barva
0-10	humusový	silné prokořenění		10YR 5/2	šedohnědá
10-20	humusový	slabé znaky glejového procesu, cca 5-10% matrice rezavé		10YR 6/2	světle hnědošedá
20-30	glejový			10YR 6/2	světle hnědošedá
30-40	glejový (red-ox)	75% matrice oxidované(rezivé) +25% matrice redukované		10YR 6/3	světle hnědá
40-50				10YR 6/3	světle hnědá
50-60	glejový (ox-red)	75% matrice redukované +25% matrice oxidované		10YR 6/2	světle hnědošedá
60-70				2.5Y 5/2	šedohnědá
70-80	fossilní humusový s přechodem do fos. glejového	silný podíl nerozložených kořenů (30-50%), redukovaná minerální matrice	ANO	2.5Y 3/2	tmavě šedohnědá
80-90			ANO	2.5Y 2.5/1	černá
90-100			ANO	2.5Y 2.5/1	černá
100-110	fossilní glejový	100% matrice redukované	ANO	GLEY 1 3/5GY	velmi tmavě zelenošedá
110-130			ANO	GLEY 1 2.5/5GY	tmavě zelenošedá
130-150			ANO	GLEY 1 2.5/5GY	tmavě zelenošedá
150-160			ANO	GLEY 1 2.5/5GY	tmavě zelenošedá

cm	pH	Eh _{měřené}	Fe	As	S	C	Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	Cl	K ₂ O	CaO	TiO ₂	MnO	BaO
0-10	5,09	312	2,64	0,16	0,06	4,31	2,89	1,12	17,35	68,85	0,15	0,01	2,51	2,02	0,51	0,10	0,07
10-20	5,28	275	2,89	0,18	0,03	2,30	2,76	1,20	17,59	68,56	0,11		2,38	1,99	0,55	0,09	0,06
20-30	5,70	252	3,93	0,62	0,08	3,40	2,29	1,38	17,97	65,70	0,14		2,38	2,22	0,72	0,12	0,08
30-40	6,52	231	3,42	0,30	0,02	1,48	2,62	1,24	17,74	65,74	0,10		2,20	2,12	0,65	0,13	0,07
40-50	6,60	183	3,28	0,34	0,06	2,74	2,14	1,44	19,29	66,74	0,08	0,01	2,37	2,04	0,81	0,14	0,06
50-60	6,34	107	3,66	0,24	0,07	2,83	1,89	1,58	19,63	66,36	0,07	0,01	2,47	1,64	0,94	0,07	0,06
60-70	6,53	26	3,06	0,44	0,34	4,97	1,91	1,50	19,94	66,09	0,08	0,01	2,48	1,83	0,93	0,08	0,06
70-80	6,33	42	3,07	0,99	0,84	9,55	1,73	1,32	19,68	64,54	0,12	0,02	2,48	2,65	0,84	0,10	0,07
80-90	6,35	28	2,87	2,46	2,45	21,00	1,95	0,98	17,72	60,20	0,12	0,03	2,33	5,31	0,57	0,14	0,07
90-100	6,45	5	2,37	0,42	0,56	8,59	2,48	1,14	20,04	65,66	0,09	0,01	2,41	3,04	0,52	0,07	0,07
100-110	6,48	36	1,16	0,31	0,30	2,86	3,81	0,69	17,40	70,38	0,06	0,01	2,24	2,89	0,22	0,03	0,05
110-130	6,92	33	2,12	0,19	0,15	0,60	3,85	1,45	16,69	65,91	0,08		2,62	2,77	0,37	0,03	0,06
130-150	6,76	42	1,88	0,17	0,15	0,69	3,75	1,48	19,18	66,76	0,08	0,01	2,66	2,82	0,36	0,03	0,06
150-160	6,89	36	1,55	0,13	0,10	0,58	3,78	1,43	19,88	66,37	0,08		3,22	2,46	0,36	0,02	0,07

5 Diskuse

V roce 2011 našel Petr Drahota a jeho diplomant Aleš Redlich na Mokrsku novotvořený biogenní realgar – As_4S_4 (Redlich 2011). Akumulace realgaru byly naprosto mimo dosah hydrotermálních roztoků. Jedná se o vůbec první nález makroskopického množství realgaru vznikého mimo prostředí ovlivněné hydrotermálními jevy. Předchozí studie našly realgar v asociaci s organickou hmotou jen na dvou lokalitách a pouze v mikroskopických množstvích, jejichž detekce byla možná jedině synchrotronovou rentgenovou absorpční spektroskopií – XAS (O'Day et al. 2004; Langner et al. 2013). Autoři těchto prací sice předpokládali vliv mikrobiální redukce síranů, ale žádné mikrobiologické analýzy neprováděli. Bioprecipitace sulfidů v asociaci s organickou hmotou byla popsána u sfaleritu (Moreau et al. 2004)

V následné studii (Drahota, Falteisek, et al. 2013) se podařilo prokázat, že jsou v mikrobiálních populacích na Mokrsku v hojné míře přítomny funkční geny kódující enzymy pro redukci arseničnanů (*arrA*, *aioA*) i redukci síranů (*dsrB*). Schopnost mikrobů reduktivně uvolňovat arsen ze sekundárního goethitu, bariofarmakosideritu či arseniosideritu autoři prokázali v inkubačních experimentech. Na lokalitě byla mikrobiální redukce síranů prokázána izotopovou analýzou síry. Analyzované mikrobiální komunity v této práci pocházely pouze ze dvou vzorků smíšeného charakteru (regolith, sediment) a pro jejich charakterizaci byly čteny pouze desítky sekvencí. To jsme se pokusili napravit vzorkováním půdního profilu po vrstvách a čtením v celém běhu 454 pyrosequencing. Sekvenace byla sice technicky zdařilá (cca 70 000 sekvencí), ale rozdělení mikrobiálních komunit se zdálo být zcela náhodné, bez detekovatelných trendů či jevů. Proto a pro nesnadnou srovnatelnost s výsledky z technologie Illumina MiSeq jsme se rozhodli tato data nepoužít. Nicméně nám tato sekvenace přinesla poučení, že je potřeba klást velký důraz na pečlivé vzorkování a dobré odlišení funkčních domén, neboť je velmi snadné smazat jakoukoli patrnost ve vzorkovaných komunitách. Proto jsme se přestali zaměřovat na horizontální vrstvy, a začali se zabývat vizuálně odlišitelnými funkčními doménami.

Každopádně už z této sekvenace bylo jasné, že Mokrsko nehostí žádný unikátní soubor organismů. To se potvrdilo i srovnáním aktuálních sekvenačních dat s referenčními komunitami (Tabulka 10). Podobné komunity byly popsány z mnoha jiných prostředí s podobnými podmínkami, bez ohledu na přítomnost zvýšených koncentrací arsenu (Obrázek 20). Hlavní trend ve srovnávacím datasetu aktuálních sekvenačních dat dohromady s referenčními komunitami se zdá být závislost na strukturovanosti prostředí od vysoce komplexních půd po homogenní vodu.

5.1 Domény

Pedologický průzkum nám dal přibližnou představu o zvrstvení i o hlavních geochemických procesech. Z principu je ale omezen pouze na rozlišení ve vertikálním směru, neboť jeho smyslem je zobecnění nálezu na širší okolí. Nám naproti tomu při mikrobiologických odběrech šlo na této škále o přesný popis konkrétní situace, a proto jsme se uchýlili k dvojrozměrnému mapování (**Obrázek 21**) a mluvíme o doménách, a ne o horizontech.

Rozložení domén jsme stanovovali čistě vizuálně podle některých dobře viditelných parametrů. Například doména Ž je dobře rozlišitelná díky vysráženému jasně žlutému realgaru (odpovídá přibližně fosilnímu humusovému horizontu, **Tabulka 11**) a doména Č je temně černá díky vysokému obsahu organického uhlíku (**Obrázek 17**) a jediné, čím se liší od domény Ž, je absence viditelného množství realgaru. Šedivá doména Š je jemnozrná, nápadně jílovitá, převážně redukovaná matrice, která odpovídá glejovému horizontu pedologického hodnocení. P je půda nad hladinou podzemní vody, ale ještě hluboko pod drnem, a tedy s malým podílem kořenů rostlin (přibližně humusový glejový horizont pedologického hodnocení). Rezavá doména R (odpovídá oxidované matici v glejovém horizontu podle pedologického hodnocení) získala svoji specifickou barvu oxidací a srážením železa, které je v nižších vrstvách naproti tomu přítomno převážně v redukované formě, a může být tedy odplavováno roztokem. Tomu dobře odpovídá vertikální vývoj jeho koncentrace (**Obrázek 16**, **Tabulka 11**), kdy v redukovaných vrstvách jeho koncentrace prudce klesá, což je patrně důležitý parametr umožňující vznik realgaru na úkor sulfidů železa.

Zásadní inovace oproti předcházející nezdařené pyrosekvenaci byla ve způsobu vzorkování. Tehdy jsme odebírali větší vzorky (několik gramů), z nichž jsme teprve v laboratoři odebírali cca 200 mg pro izolaci DNA. Při tomto zbytečném mezikroku muselo docházet k částečné homogenizaci a přečtené komunity pak měly příliš směsný charakter, který zastíral jakékoli patrnosti. Tentokrát jsme odebírali finální vzorek (cca 200 mg) rovnou do lyzačního roztoku, čímž jsme se zbavili jednoho mezikroku. Je známo, že i takto malý vzorek půdy má stále ještě směsný charakter, protože zahrnuje množství odlišných mikrohabitatů. Představuje nicméně rozumný kompromis (Nemergut et al. 2013) mezi velkými směsnými vzorky a mikroskopicky malými vzorky, z nichž oboje přinášejí svůj typ chyby. U příliš velkých vzorků je riziko zastření ekologických gradientů odebráním jejich větších rozsahů. Mikroskopicky malé vzorky zase jednak přinášejí technické obtíže kvůli malému množství DNA a jednak ve složení jejich komunit už hrají příliš velkou roli neutrální procesy a náhoda, která se projevuje na úrovni osidlování jednotlivých zrn substrátu.

Složení komunit a PCoA jejich fylogenetických vzdáleností (**Obrázek 19**) jasně ukazuje gradient od domény P a R přes Š a Č až k Ž. Vzorky typu RE a vzorky z inkubací jsou v rámci svého typu poměrně divergentní, přesto tvoří jednoznačně odlišitelné klastry (**Tabulka 9**).

Vysoká variabilita mikrobiálních komunit v rámci RE domény a v rámci inkubací je nejspíš způsobena tím, že nemají nárůzdíl od ostatních domén směsný charakter. Jde o relativně homogenní a na úrovni prostorové vzorkovací škály spojitá stanoviště, vyskytující se ovšem nespojitě v podobě ostrůvků. Vzorky ostatních domén jsou půdy zahrnující různě zrnitý materiál, který sice tvoří kontinuální oblast kolem pohřbených dřev, ale zato je daleko méně homogenní. Jak už víme z předchozích výzkumů (Falteisek et al. 2016), prostorově nespojitý habitat, ač ve svých podmínkách vysoce konzistentí, má tendenci být obsazován poměrně odlišnými komunitami. To je v souladu se současným modelem tvorby mikrobiálních komunit, který předpokládá vysokou roli náhodných procesů (Nemergut et al. 2013).

Vzorky RE a Ž, tedy ty s viditelným množstvím realgaru, se vyznačují vysokým zastoupením síran redukujících OTU (např. 25, 37, 40, 46, 58, 8, 110, 159, 234). Vysoké koncentrace síry a arsenu v těchto vzorcích (Obrázek 17) lze proto přičítat jejich metabolismu. Po zredukování mikrobiální respirací se zde ukládají ve formě realgaru.

Doména Č se ve své struktuře příliš neliší od domény Ž. Organického uhlíku má dokonce ještě o trochu víc (Obrázek 17), a přesto se v ní realgar ve viditelném množství nesráží. Může to být způsobeno specifickým prouděním půdní vody, která třeba do těchto míst nepřináší dostatek síranů, nebo naopak přináší dostatek lepších elektronových akceptorů. Rovněž je možné, že zde probíhají stejné procesy jako v doméně Ž, jen s menší intenzitou, nebo je zde silnější proudění vody, která odplavuje produkty reakcí, a tak nedochází k přesycení roztoku vůči realgaru. Nejspíš právě díky kombinaci více dílčích geochemických procesů komunity této domény netvoří v PCoA jednoznačný klastr a splývají s většinou ostatních domén (Tabulka 9). Každopádně ale doména Č dokazuje, že dostatek dřevní hmoty není postačující podmínkou pro vznik realgaru.

Zda je srážení realgaru asociované s konkrétní strukturou dřevní hmoty, se nám nepodařilo prokázat. Vznik realgaru v inkubaci 3.3, kde byl nalezen i ve vrstvách papíru, které se klacku přímo nedotýkaly, spíše ukazuje na gradientotvornou roli dřevní hmoty, než na roli nukleační. Rovněž se nám nepodařilo nalézt přímou asociaci realgaru s mikrobiálními buňkami.

5.2 Inkubace

V předcházejícím výzkumu se podařilo inkubačními mikrokosmovými experimenty prokázat schopnost mikroorganismů reduktivně uvolňovat arsen ze sekundárních minerálů (Drahota, Falteisek, et al. 2013), ale nedozvěděli jsme se nic o jeho srážení v redukčním prostředí. Z pozorování na lokalitě jsme získali podezření, že dřevní hmota hraje ve srážení realgaru klíčovou roli, a proto jsme dřevní hmotu zakomponovali do následných inkubací.

V první sérii inkubací jsme přidali dřevní hmotu a chtěli jsme testovat pouze vliv dokrmení systému zdrojem uhlíku na ustavení anaerobie a případné srážení realgaru. Zvolili jsme nefermentovatelný substrát, abychom mikroorganismy donutili prodýchat sírany a arseničnany. Bylo pro nás velkým překvapením, když jsme po půl roce zjistili, že se nám realgar skutečně vysrážel, a ještě větším překvapením bylo, že se vysrážel v kontrolních lahvích, které jsme otrávil azidem. Dokrmení zůstalo bez efektu. Tyto výsledky nás vedly k domněnce, že azid nepronikl do dřeva, kde část mikroorganismů tvořících biofilmy přežila, a že je toto uspořádání z nějakého důvodu pro vznik realgaru důležité. Proto jsme v druhé sérii inkubací začali testovat i přídavky antibiotik. O těch je známo, že do biofilmu pronikají obtížně (Stewart 2002), čímž by mohl být tento efekt ještě zesílen.

Výsledky inkubací naznačují, že je pro vznik realgaru důležité, aby byl mikrobiální metabolismus prostorově omezen na dřevní hmotu, nebo dokonce jen na biofilmy na jejím povrchu. V první sérii inkubací se nám toho podařilo mimoděk docílit nízkou dávkou azidu, nedostatečnou pro úplnou sterilizaci. V dalších inkubacích jsme stejného efektu dosáhli již cíleně antibiotiky. Druhá série pak potvrdila, že nízká koncentrace azidu vznik realgaru podpoří oproti inkubaci bez inhibice, kdežto vyšší koncentrace už celou inkubační láhev dokonale sterilizuje, včetně vnitřního prostředí dřevní hmoty, a tím vznik realgaru dokonale zastaví. Antibiotika ukázala, že nejde o specifický účinek azidu, ale k podobnému výsledku vedou i jiné způsoby inhibice mikrobiální aktivity v roztoku.

Inkubace 3.3, kde byl prokázán vznik realgaru v papíru obalujícím dřevo, dokázala, že nejde o falešné výsledky způsobené zviditelněním realgaru, který by mohl být na dřevě přítomen již při zakládání inkubace. Rovněž vyloučila případnou nukleární roli takovéto počáteční kontaminace realgarem.

Pokud je nám známo, i přes jiné pokusy o biogenní srážení sulfidů arsenu v podmínkách laboratorní inkubace (Demergasso et al. 2007) je tato práce vůbec první, kde se podařilo vysrážet realgar v inkubačních podmínkách.

5.3 Mechanismus biogeneze realgaru

Hypotetický mechanismus účinku azidu, či antibiotik a vůbec biogeneze realgaru je následující: Pokud do inkubace přidáme takové množství inhibiční látky, že sterilizujeme roztok a zároveň nezabijeme veškerý život v dřevní hmotě, umožníme vznik ostré přechodové zóny na jejím povrchu, kde je ze strany dřeva přebytek elektronových donorů (organický uhlík) a ze strany roztoku přísun akceptorů (sírany a arseničnanů). Tím, že je veškerá produkce sulfidické síry a trojmocného arsenu lokalizována do tenké vrstvy na povrchu dřeva, může zde docházet k přesycení roztoku vůči realgaru a k jeho srážení. Pokud by redukce síranů a arseničnanů probíhala volně v roztoku, došlo by k jejich spotřebování, aniž by bylo dosaženo dostatečných koncentrací.

V přírodě mimo inkubaci je situace odlišná především v tom, že se nejedná o uzavřený systém. Proto je možné srážení realgaru i bez inhibice metabolismu v roztoku, neboť nehrozí bezprostřední vyčerpání zdrojů síranů a arseničnanů. Ty mohou stále přitékat s podzemní vodou z jiných míst. To ale určitě není jediná nutná podmínka. I zde bude zřejmě důležitá struktura dostupného organického substrátu. Ten musí být dostatečně fragmentovaný. Pokud by byl dostupný organický uhlík v půdě rovnoměrně rozptýlen, nemohlo by k vytvoření onoho ostrého rozhraní se striktně lokalizovanou respirační síranů a arseničnanů dojít. Je pravděpodobné, že k přesycení půdního roztoku vůči realgaru by v takových podmínkách nedošlo.

Je také možné, že tento navrhovaný mechanismus působí synergicky s tvorbou komplexů As s organickou hmotou, podobně, jak ji popsali (Langner et al. 2013).

Podle analýz pedologických profilů spolu velmi dobře korelují obsahy celkové síry, organického uhlíku a celkového arsenu. Všechny tyto složky dosahují maxima kolem 80 cm hloubky, kde také začíná směrem k povrchu stoupat redukční potenciál. Tato skutečnost dobře odpovídá představě, že z oxidačního a relativně oligotrofního prostředí v horních vrstvách difundují rozpuštěné sírany do vrstev bohatých na organický uhlík (pohřbená dřevní hmota), kde jsou prodýchány a vysráženy v podobě sulfidů arsenu.

Zároveň lze z pedologických analýz a z historie lokality usuzovat na to, že dnešní zvrstvení, kdy je vrstva velmi bohatá na dřevní hmotu a organický uhlík překryta vrstvami na uhlík mnohem chudšími, získalo svůj základ při melioraci v roce 1980. Tehdy patrně byly olšové větve, pařezy a kořeny uloženy do břehu čerstvě vyhloubené odvodňovací strouhy. Tím se dostaly pod hladinu podzemní vody a daly základ silně redukčnímu prostředí s přebytkem makroskopických kusů dřeva v těsné blízkosti oligotrofnější oxidované vrstvy, která může být zdrojem rozpuštěných síranů a arseničnanů. Srážení realgaru by bez toho nejspíš probíhalo na této lokalitě v mnohem menší míře.

Další podmínkou srážení realgaru je dostatečně nízká koncentrace železnatých iontů, neboť železo tvoří sulfidy ochotněji, než arsen. Na druhou stranu je Fe^{3+} také lepším elektronovým akceptorem, než As^{5+} . Dá se proto očekávat, že při difuzi napříč redoxním gradientem směrem do redukčních podmínek bude k produkci Fe docházet dříve než k produkci As^{3+} , a tím i dále od produkce S^{2-} . To by mohlo zase čistě prostorově zvýhodnit tvorbu sulfidů arsenu. Krom toho je zde obsah Fe celkově nízký. Každopádně skutečnost, že v klastru domén se signifikantně vyšším obsahem síry jsou jen domény s realgarem (Tabulka 4), znamená, že zde pravděpodobně není žádná jiná významná pevná fáze síry.

5.4 Kam dál?

Definitivním ověřením role dřeva a antibiotik či azidu při biogenním srážení realgaru by mohla být inkubace, ve které by byly živé mikroorganismy odděleny od sterilní většiny objemu roztoku dostatečně jemnou membránou tak, aby na této membráně byla zajištěna tvorba rozhraní, kde se redukuje sírany. Pokud je výše uvedená hypotéza mechanismu srážení realgaru správná, měl by se realgar srážet na této membráně.

Pro zjištění role konkrétních bakteriálních komunit, případně přítomnosti horizontálně nasdílených genů zajišťujících rezistenci k vysokým koncentracím arsenu, by bylo dobré zkusit inokulovat inkubace komunitami ze zcela vzdálených lokalit, a to jednak z obvyčejného anoxického sedimentu, jednak z anoxického sedimentu s vysokým obsahem arsenu, ale bez realgaru.

Tyto experimenty by rovněž mohly pomoci definitivně vyřešit otázku, zda je srážení realgaru řízeno pouze strukturou substrátu a mikroorganismy zde hrají roli pouze univerzálního katalyzátoru, nebo zda je nezbytná kombinace konkrétních druhů bakterií. Už při současném stavu poznání ale považujeme druhou možnost za nepravděpodobnou.

6 Závěr

Podařilo se nám ukázat, že biogenní srážení realgaru *in vitro* je možné. Podporuje jej omezení mikrobiální aktivity do dřevní hmoty či na její povrch.

Výsledky této práce naznačují, že bioprecipitace realgaru na Mokrsku není podmíněna přítomností nějakého specifického mikroorganismu. Spíš je výsledkem kontrastního sousedství mikrohabitátů, na jejichž rozhraní je lokalizovaná významná část mikrobiální aktivity, která vyžaduje vstupy z obou stran.

Z toho vyplývá, že konečný produkt metabolických reakcí je pravděpodobně mimo jiné determinován i strukturou a zrnitostí prostředí, která rozhoduje o tom, jak prudké gradienty mohou na rozhraních funkčních domén vzniknout.

Může se zdát, že celá tato práce se jen snaží objasnit vysoce obskurní jev, jakým bez pochyby bioprecipitace realgaru je, ale je možné se na celý problém podívat i z druhé strany. Máme ohromné štěstí, že je realgar díky své jasné žluti tak dobře vidět, neboť je výsledkem procesů, které jsou jinak skryté a analytickými metodami nepostižitelné. Realgar je vizualizuje a může tak být využit jako jejich indikátor. Biogenní srážení realgaru je sice velmi vzácný jev, ale procesy, které k němu vedou, jsou dost možná všudypřítomné, jenom nemají v jiných podmínkách takto výrazný projev. Proto by srážení realgaru mohlo být velmi cenným modelem pro zkoumání těchto procesů a jejich mechanismů.

7 Literatura

Altschul S, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402.

Aronesty E. 2013. Comparison of Sequencing Utility Programs. *The Open Bioinformatics Journal* **7**.

Bobek P. 2013. Určení dřeva. Osobní sdělení.

Boettger J, Lin HT, Cowen JP, Hentscher M, Amend JP. 2013. Energy yields from chemolithotrophic metabolisms in igneous basement of the Juan de Fuca ridge flank system. *Chemical Geology* **337-338**: 11–19.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* **6**: 1621–1624.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl** : 4516–22.

Colmer AR, Hinkle ME. 1947. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report. *Science (New York, N.Y.)* **106**: 253–6.

Cordero OX, Polz MF. 2014. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nat Rev Microbiol* **12**: 263–273.

David E. Cummings †, Frank Caccavo J, Scott Fendorf § and, R. Frank Rosenzweig* †. 1999. Arsenic Mobilization by the Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacterium *Shewanella alga* BrY.

Demergasso CS, Guillermo CD, Lorena EG, Mur JJP, Pedrós-Alió C. 2007. Microbial Precipitation of Arsenic Sulfides in Andean Salt Flats. *Geomicrobiology Journal* **24**: 111–123.

Drahota P, Falteisek L, Redlich A, Rohovec J, Matoušek T, Čepička I. 2013. Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly. *Environmental Pollution* **180**: 84–91.

Drahota P, Mikutta C, Falteisek L, Duchoslav V, Klimentová M. In print. *Biogenic formation of realgar deposits in the soil.*

Drahota P, Nováková B, Matoušek T, Mihaljevič M, Rohovec J, Filippi M. 2013. Diel variation of arsenic, molybdenum and antimony in a stream draining natural As geochemical anomaly. *Applied Geochemistry* **31**: 84–93.

Drahota P, Paces T, Pertold Z, Mihaljevic M, Skriván P. 2006. Weathering and erosion fluxes of arsenic in watershed mass budgets. *Science of the Total ...* **372**: 306–316.

Drahota P, Rohovec J, Filippi M, Mihaljevic M, Rychlovský P, Cervený V, Pertold Z. 2009. Mineralogical and geochemical controls of arsenic speciation and mobility under different redox conditions in soil, sediment and water at the Mokrsko-West gold deposit, Czech Republic. *The Science of the total environment* **407**: 3372–84.

Edgar RC. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* **10**: 996–8.

Falteisek L, Duchoslav V, Čepička I. 2016. Substantial Variability of Multiple Microbial Communities Collected at Similar Acidic Mine Water Outlets. *Microbial Ecology* **72**: 163–174.

Fazi S, Crognale S, Casentini B, Amalfitano S, Lotti F, Rossetti S. 2016. The Arsenite Oxidation Potential of Native Microbial Communities from Arsenic-Rich Freshwaters. *Microbial Ecology* **72**: 1–11.

Fraser C, Alm EJ, Polz MF, Spratt BG. 2009. The Bacterial Species Challenge: Making Sense of Genetic and Ecological Diversity. *Evolution Evolution Nature Trends Ecol. Evol. Mol. Ecol. Mol. Biol. Evol. J. West Mol. Ecol. N. Phadnis, J. Hered. D. A. Levin, Syst. Bot. Science Trends Genet. Curr. Biol.*

Evolution **32**: 741–746.

Fukami T. 2010. Community assembly dynamics in space. *Community Ecology: Processes, Models, and Applications*.

Hanada S. 2016. Anoxygenic Photosynthesis —A Photochemical Reaction That Does Not Contribute to Oxygen Reproduction—. *Microbes and environments* **31**: 1–3.

Hazen RM, Papineau D, Bleeker W, Downs RT, Ferry JM, McCoy TJ, Sverjensky D a., Yang H. 2008. Mineral evolution. *American Mineralogist* **93**: 1693–1720.

<http://rruff.info/ima/>. 2016. IMA Mineral List with Database of Mineral Properties.

Hudson-Edwards K, Santini J. 2013. Arsenic-Microbe-Mineral Interactions in Mining-Affected Environments. *Minerals* **3**: 337–351.

Ivanov M V, Karavaiko GI. 2004. [Geological microbiology]. *Mikrobiologiya* **73**: 581–97.

Janatka J, Morávek P. 1990. Geochemical exploration in the Jílové Belt: case history of the Celina deposit, Bohemian Massif, Czechoslovakia. *Journal of Geochemical Exploration* **37**: 367–384.

Jílek V. 1985. *Mokrsko-geomedicínská studie*. Praha.

Johnson DB. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **27**.

Katoh K, Asimenos G, Toh H. 2009. Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. **39–64**.

Kulhavý Z. 2014. *Osobní sdělení*. Prostřední Lhota - odvodnění pozemků.

Langner P, Mikutta C, Suess E, Marcus MA, Kretzschmar R. 2013. Spatial distribution and speciation of arsenic in peat studied with microfocused X-ray fluorescence spectrometry and X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science and Technology* **47**: 9706–9714.

Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8228–8235.

McCollom T, Amend J. 2005. A thermodynamic assessment of energy requirements for biomass synthesis by chemolithoautotrophic micro-organisms in oxic and anoxic environments. *Geobiology* **3**: 135–144.

McMurdie PJ, Holmes S. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data (M Watson, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e61217.

Morávek P, Janatka J, Pertoldová J, Straka E, Durišová J, Pudilová M. 1989. Mokrsko gold deposit—the largest gold deposit in the Bohemian Massif, Czechoslovakia. *Econ. Geol. Monograph* **6**: 252–259.

Moreau JW, Webb RI, Banfield JF. 2004. Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. *American Mineralogist* **89**: 950–960.

Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF, Knelman JE, Darcy JL, Lynch RC, Wickey P, Ferrenberg S. 2013. Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **77**: 342–56.

Nickson RT, Mcarthur JM, Ravenscroft P, Burgess WG, Ahmed KM. 2000. Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Applied Geochemistry* **15**: 403–413.

Nordstrom DK. 2002. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**: 2143–5.

O'Day P a, Vlassopoulos D, Root R, Rivera N. 2004. The influence of sulfur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13703–13708.

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria*.

Redlich A. 2011. Mikrobiální mobilizace arsenu v půdách na zlatonosném ložisku Mokrsko.

Reisinger HJ, Burris DR, Hering JG. 2005. Remediating subsurface arsenic contamination with monitored natural attenuation. *Environmental science & technology* **39**: 458A–464A.

Rochette EA, Li GC, Fendorf SE. 1998. Stability of Arsenate Minerals in Soil under Biotically Generated Reducing Conditions. *Soil Science Society of America Journal* **62**: 1530.

Rosselló-Móra R. 2012. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environmental Microbiology* **14**: 318–334.

Sexstone AJ, Revsbech NP, Parkin TB, Tiedje JM. 1985. Direct Measurement of Oxygen Profiles and Denitrification Rates in Soil Aggregates1. *Soil Science Society of America Journal* **49**: 645.

Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International* **35**: 743–759.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537–7541.

Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**: 1312–3.

Stewart PS. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology* **292**: 107–113.

Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology* **46**: 327–338.

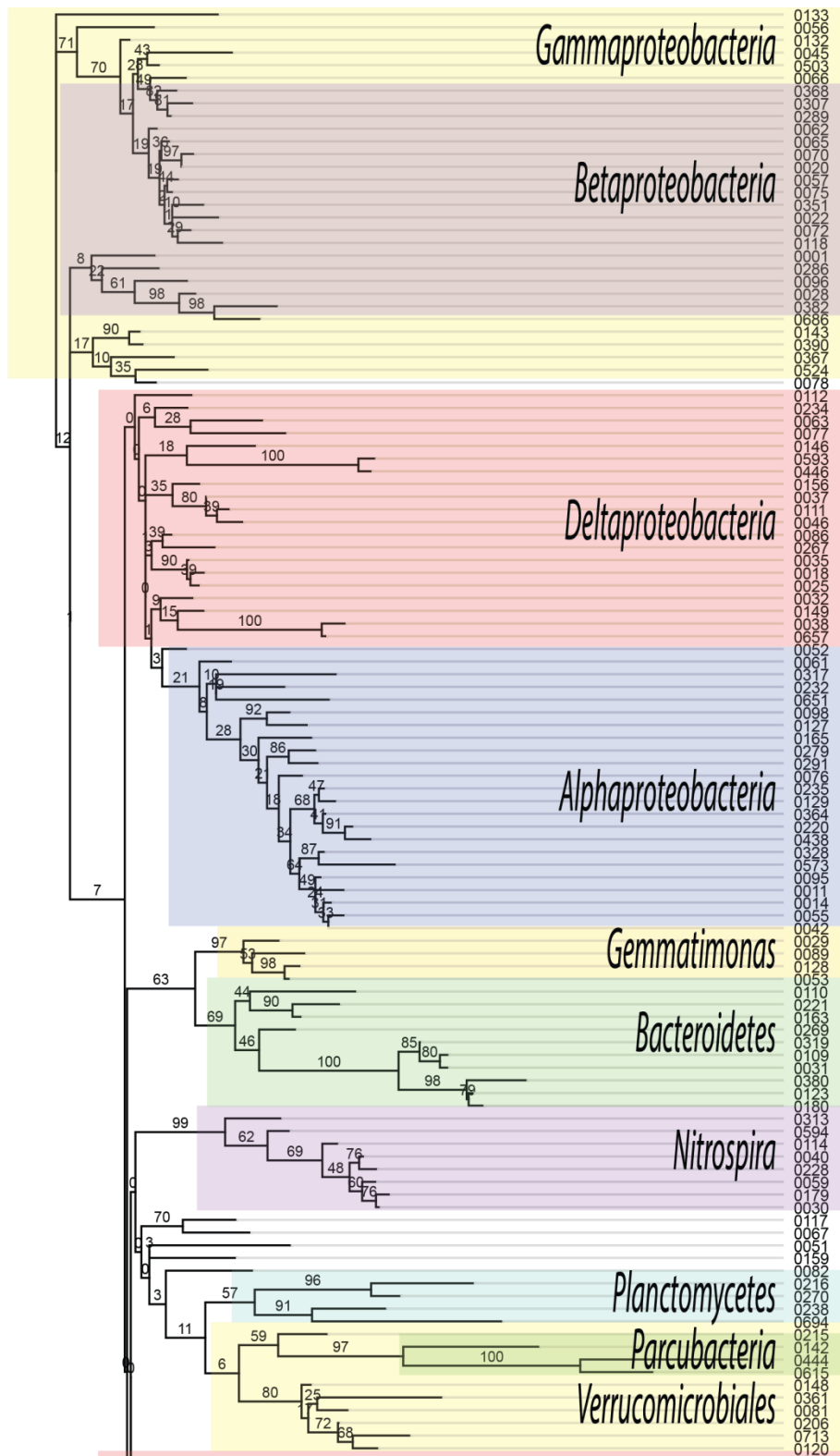
Větrovský T, Baldrian P. 2013. Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils* **49**: 1027–1037.

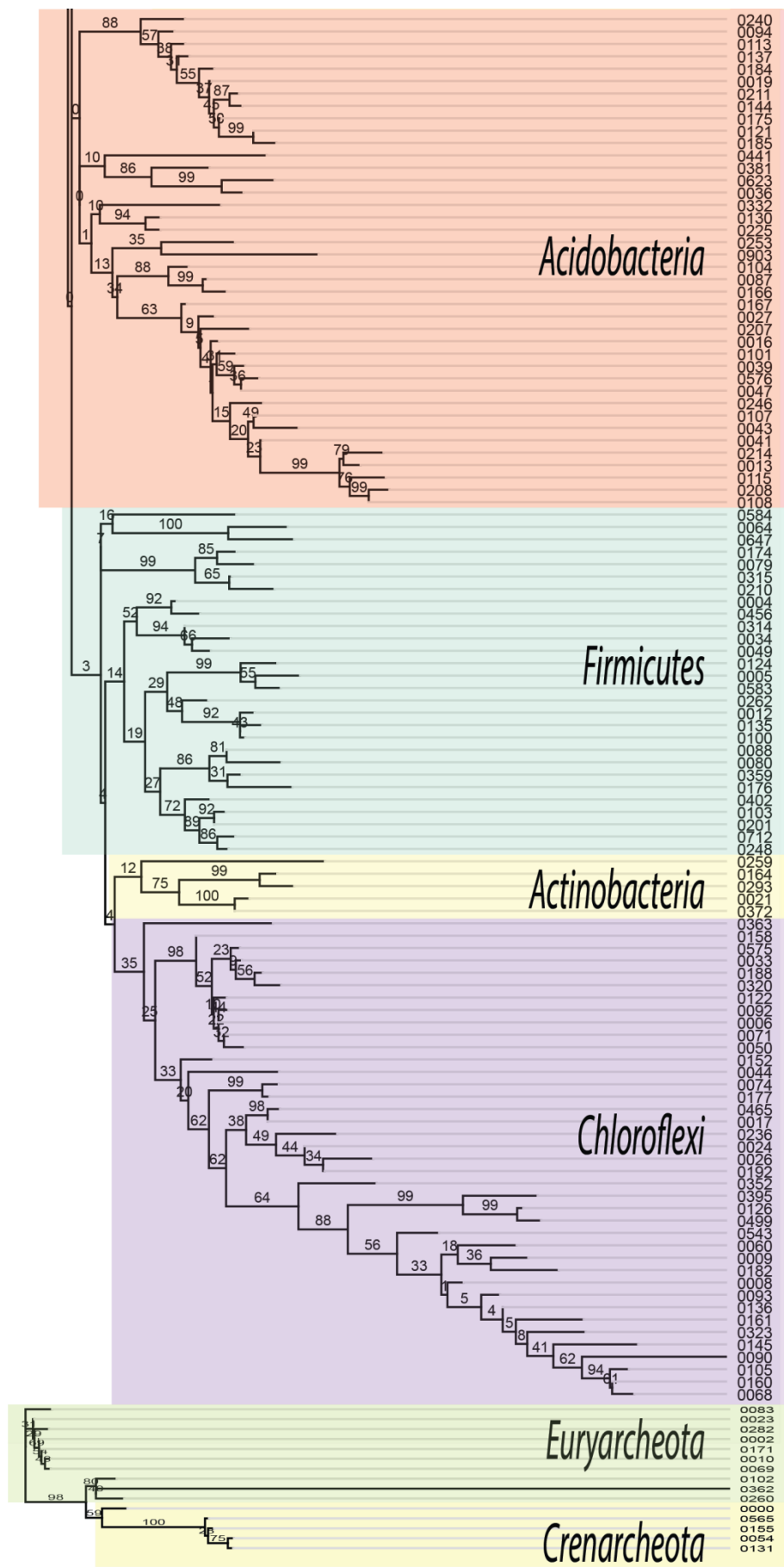
Wang J, Muyzer G, Bodelier PLE, Laanbroek HJ. 2009. Diversity of iron oxidizers in wetland soils revealed by novel 16S rRNA primers targeting Gallionella-related bacteria. *The ISME Journal* **3**: 715–725.

Zachariáš J, Morávek P, Gadas P, Pertoldová J. 2014. The Mokrsko-West gold deposit, Bohemian Massif, Czech Republic: Mineralogy, deposit setting and classification. *Ore Geology Reviews* **58**: 238–263.

8 Přílohy

Obrázek 23: Fylogenetický strom hojných OTU s procentuální podporou větvení podle bootstrap.
Zahrnuty byly otu, které tvoří alespoň 1 % sekvencí v alespoň jednom vzorku.





Tabulka 12: Přehled nejhojnějších OTU s jejich přibližným zařazením podle srovnání s databáze GeneBank a s jejich abundancí ve vzorcích.

[illegible]

58

